



**Caraterização da atividade antimicrobiana da alga
Plocamium cartilagineum para aplicações biotecnológicas**

Cristiana Isabel Reis Fonseca

Mestrado em Microbiologia Aplicada

Dissertação orientada por:
Professor Doutor Rui Filipe Pinto Pedrosa
Professora Doutora Maria Manuela Spratley Saraiva de Lemos Carolino



O trabalho apresentado nesta Dissertação de Mestrado foi realizado no MARE–Politécnico de Leiria, Edifício CETEMARES, sob a orientação direta do Professor Doutor Rui Filipe Pinto Pedrosa.

A Professora Doutora Maria Manuela Spratley Saraiva de Lemos Carolino foi a orientadora interna, designada no âmbito do Mestrado em Microbiologia Aplicada da Faculdade de Ciências da Universidade de Lisboa.

À minha família,
ao Nuno.

AGRADECIMENTOS

A realização desta dissertação de mestrado foi um longo percurso, com uma trajetória marcada por inúmeros desafios, novos conhecimentos, novas amizades, tristezas e alegrias, dúvidas e percalços pelo caminho, mas acima de tudo, sinto-me grata por tê-lo realizado. Apesar de ser um percurso maioritariamente solitário, teve o contributo direto e indireto de várias pessoas.

Em primeiro lugar, quero parabenizar o MARE –Politécnico de Leiria, Edifício CETEMARES, pelas excelentes instalações, que nos permitem desenvolver ciência com todas as condições necessárias, assim como pelo excelente trabalho científico que nele tem sido desenvolvido nestes últimos anos, enaltecendo a cidade que o acolhe, a minha cidade natal.

De seguida, quero agradecer ao fantástico grupo de investigação que me acolheu, liderado pelo Professor Doutor Rui Pedrosa. Aos Doutores Celso Alves e Alice Martins, à Mestre Joana Silva e, especialmente, à Doutora Susete Pintéus pela sua paciência, ajuda, ensinamento e palavra amiga. Aos colegas de bancada, Joana Rosa, Fernando Teodoro, Rafaela Freitas, Juanjo Córdoba e Patrícia Susano, obrigada por toda a ajuda e pelos bons momentos passados.

À Professora Doutora Maria Manuela Carolino, minha orientadora interna, por toda a entajuda e disponibilidade demonstrada, mesmo após a sua aposentação, e por toda a confiança depositada em mim, nas minhas capacidades e no meu trabalho.

Aos colegas do mestrado de Microbiologia Aplicada, com os quais convivi durante um longo ano de aulas teóricas e práticas. Agradeço a estes “miúdos” fantásticos que sempre se disponibilizaram para me ajudar sempre que não me era possível estar presencialmente nas aulas, em especial, ao Luís Filipe e à Francisca Moreira, por todo o material de apoio que me disponibilizaram.

À Fundação para a Ciência e a Tecnologia (FCT) pelo financiamento concedido através dos projetos de investigação POINT4PAC (SAICTPAC/0019/2015-LISBOA-01-0145-FEDER-016405) e CrossAtlantic (PTDC/BIA-OUT/29250/2017).

E, por fim, à minha família e ao Nuno Camilo, por todo o apoio e amor que me dão, pela paciência que têm em me aturar e por toda a compreensão que tiveram pela minha ausência nestes últimos dois anos.

A todos muito obrigada, do coração!

RESUMO

A resistência aos antimicrobianos é uma ameaça crescente à saúde pública a nível global, tendo forte impacto quer na saúde humana quer na saúde animal, assim como um impacto económico nas sociedades atuais. A necessidade de novas soluções antimicrobianas tem remetido muitos investigadores para o uso de produtos naturais marinhos como fonte de novas moléculas biologicamente ativas. O objetivo principal desta dissertação focou-se na avaliação do potencial antimicrobiano da alga *Plocamium cartilagineum* contra microrganismos patogénicos humanos e de peixes.

Foram realizadas duas extrações independentes, com diclorometano-metanol e etanol-água, a partir da biomassa seca da alga *P. cartilagineum*. A atividade antimicrobiana dos extratos/ frações foi avaliada contra 13 microrganismos, que incluem bactérias gram-positivas e gram-negativas, e fungos (patogénicos para o Homem e para os peixes). Verificou-se que os extratos/ frações possuem atividade contra *Staphylococcus aureus*, *Cutibacterium acnes*, *Staphylococcus epidermidis*, *Vibrio anguillarum* e *Edwardsiella tarda*, sendo a fração mais apolar do extrato de etanol-água a mais potente. A inibição da formação de biofilme foi também avaliada, tendo-se verificado que os extratos/ frações inibem a formação de biofilme produzido por *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa* e *E. tarda*. Paralelamente, foram estudados os mecanismos de ação dos diversos extratos/ frações, onde se verificou que, dependendo dos microrganismos em causa, os extratos/ frações podem atuar a nível da degradação do DNA ou da membrana plasmática. A avaliação da toxicidade dos extratos/ frações, foi estudada quanto à capacidade de promover hemólise em eritrócitos de carneiro, assim como, a citotoxicidade foi avaliada numa linha celular de fibroblastos de rato (células 3T3). Verificou-se que os extratos/ frações não provocam hemólise significativa, no entanto, à exceção da fração de acetato de etilo proveniente do extrato hidroalcoólico, todos diminuem significativamente a viabilidade celular de fibroblastos 3T3. A análise preliminar da fração com maior potencial bioativo, por ressonância magnética nuclear de próton, evidenciou a presença de monoterpenos mono- e polihalogenados como constituintes maioritários, sugerindo que estes metabolitos poderão ser os responsáveis pelas propriedades antimicrobianas observadas.

Em conclusão, verificou-se que os diferentes extratos revelaram potencial antimicrobiano e de inibição da formação de biofilmes, sendo a macroalga em estudo um recurso natural a explorar com vista à descoberta de novos agentes antimicrobianos. O conhecimento obtido através deste estudo pode ser útil na formulação de novos antimicrobianos para aplicação médica, assim como para aplicação veterinária, em sistemas de aquacultura.

Palavras-chave: biofilme; monoterpenos mono- e polihalogenados; *Plocamium cartilagineum*; resistência antimicrobianos.

ABSTRACT

Antimicrobial resistance is a growing threat to global public health, having a strong impact on both human and animal health, as well as an economic impact on today's societies. The need for new antimicrobial solutions has led many researchers to use natural marine products as a source of new biologically active molecules. The main objective of this dissertation was to evaluate the antimicrobial potential of the algae *Plocamium cartilagineum* against human and fish pathogenic microorganisms.

Two independent extractions were performed, with dichloromethane-methanol and ethanol-water, from the dry biomass of the alga *P. cartilagineum*. The antimicrobial activity of the extracts/ fractions was evaluated against 13 microorganisms, which include gram-positive and gram-negative bacteria, and fungi (pathogenic to humans and fish). It was found that the extracts/ fractions have activity against *Staphylococcus aureus*, *Cutibacterium acnes*, *Staphylococcus epidermidis*, *Vibrio anguillarum* and *Edwardsiella tarda*, being the most potent, the ethanol-water extract. The inhibition of biofilm formation was also evaluated, and it was verified that the extracts/ fractions inhibit the formation of biofilm produced by *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa* and *E. tarda*. Simultaneously, the mechanisms of action of the various extracts/ fractions were studied, where it was found that, depending on the microorganisms in question, the extracts / fractions can act in terms of DNA or plasmatic membrane degradation. The evaluation of the toxicity of the extracts/ fractions was studied as to the ability to promote hemolysis in sheep erythrocytes, as well as the cytotoxicity was evaluated in a cell line of rat fibroblasts (3T3 cells). It was found that the extracts/ fractions do not cause significant hemolysis, however, with the exception of the fraction of ethyl acetate from the hydroalcoholic extract, all significantly decrease the cell viability of 3T3 fibroblasts. The preliminary analysis of the fraction with the highest bioactive potential, by proton nuclear magnetic resonance, showed the presence of mono- and polyhalogenated monoterpenes as major constituents, suggesting that these metabolites may be responsible for the observed antimicrobial properties.

In conclusion, it was found that the different *P. cartilagineum* extracts have antimicrobial potential against different pathogenic microorganisms well as biofilm formation inhibitory ability, demonstrating the high potential of this natural resource to be explored with a view to discover new antimicrobial agents. The knowledge obtained through this study can be useful in the formulation of new antimicrobials for medical application, as well as for veterinary application, in aquaculture systems.

Keywords: antimicrobial resistance; biofilm; *Plocamium cartilagineum*; mono- and polyhalogenated monoterpenes.

ÍNDICE

Agradecimentos	v
Resumo	vi
Abstract	vii
Índice	viii
Índice de Tabelas	x
Índice de Figuras	xi
Lista de Abreviaturas.....	xiii
Lista de Unidades	xv
Introdução.....	1
1.1 Biodiversidade do ambiente marinho	2
1.1.1 Algas como fonte de compostos bioativos	2
1.2 A importância do desenvolvimento de novos antimicrobianos e o seu papel na saúde pública	3
1.2.1 Resistência a antimicrobianos: principais considerações	4
1.2.2 Resistências a antimicrobianos e implicações na prática clínica humana	6
1.2.3 Resistências a antimicrobianos na atividade veterinária – a aquacultura	7
1.3 Biofilme no contexto das resistências a antimicrobianos	8
1.4 Os microrganismos e a indústria dermocosmética	10
1.5 Potencial biotecnológico da macroalga <i>Plocamium cartilagineum</i>	11
Objetivos	13
2.1 Objetivo Geral	13
2.2 Objetivos Específicos	13
Materiais e Métodos	14
3.1 Recolha e preparação da alga <i>Plocamium cartilagineum</i>	14
3.1.1 Local de amostragem.....	14
3.1.2 Acondicionamento e transporte das amostras.....	14
3.1.3 Triagem, identificação e conservação das amostras	14
3.2 Preparação dos extratos/ frações.....	14
3.3 Culturas microbianas	16
3.4 Meios de cultura	16
3.5 Conservação das culturas microbianas	17
3.6 Revitalização das culturas microbianas	17
3.7 Avaliação da atividade antimicrobiana.....	17

3.8 Avaliação da atividade inibitória da formação de biofilme	18
3.9 Avaliação dos danos de DNA.....	19
3.9.1 Preparação do gel de agarose.....	19
3.9.2 Eletroforese em gel de agarose.....	19
3.10 Avaliação dos danos de membrana / parede celular.....	19
3.11 Avaliação da atividade hemolítica dos extratos/ frações.....	20
3.12 Avaliação do potencial citotóxico dos extratos/ frações.....	21
3.12.1 Manutenção da cultura celular.....	21
3.12.2 Método de MTT	21
3.13 Perfil químico da amostra com maior potencial bioativo	22
3.14 Tratamento de dados e análise estatística	22
Resultados	23
4.1 Atividade antimicrobiana de extratos/ frações de <i>Plocamium cartilagineum</i>	23
4.1.1 Atividade antimicrobiana em microrganismos patogênicos humanos	23
4.1.2 Atividade antimicrobiana em microrganismos patogênicos de peixes.....	27
4.2 Efeito dos extratos na inibição da formação de biofilme	31
4.2.1 Inibição da formação de biofilme produzido por microrganismos patogênicos humanos	31
4.2.2 Inibição da formação de biofilme produzido por microrganismos patogênicos de peixes.....	34
4.3 Efeitos dos extratos no DNA plasmídeo.....	36
4.4 Efeitos dos extratos na membrana plasmática dos microrganismos.....	36
4.5 Atividade hemolítica dos extratos	39
4.6 Citotoxicidade dos extratos em fibroblastos 3T3	40
4.6 Caracterização química da fração EA	40
Discussão e Conclusão.....	42
Perspetivas Futuras.....	49
Bibliografia	50
Anexos	58
Anexo A: Potencial antimicrobiano vs. potencial de inibição da formação de biofilme.....	58

ÍNDICE DE TABELAS

Tabela 3.1 Extratos/ frações a partir da alga <i>Plocamium cartilagineum</i> , respetivas designações e rendimentos.	16
Tabela 3.2 Condições de crescimento das estirpes em estudo.	17
Tabela 4.1 IC ₅₀ (µg.mL ⁻¹) do extrato DM e das frações EA, ED, AE e AQ da alga <i>Plocamium cartilagineum</i> , assim como, dos controlos positivos, oxitetraciclina e anfotericina B, nos diferentes fungos, bactérias gram-positivas e bactérias gram-negativas estudadas..	30
Tabela 4.2 Valor em percentagem de hemólise provocado pelos diferentes extratos/frações de <i>Plocamium cartilagineum</i> em eritrócitos de carneiro.	39
Tabela 4.1 IC ₅₀ (µg.mL ⁻¹) do extrato DM e das frações EA, ED, AE e AQ da alga <i>Plocamium cartilagineum</i> , assim como dos controlos positivos, oxitetraciclina e anfotericina B, nos diferentes fungos, bactérias gram-positivas e bactérias gram-negativas estudadas..	30
Tabela 4.2 Valor em percentagem de hemólise provocado pelos diferentes extratos/frações de <i>Plocamium cartilagineum</i> em eritrócitos de carneiro	39

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1.1 Alvos celulares das principais famílias de antibióticos (azul); e mecanismos bacterianos de resistência a antibióticos (vermelho).....	5
Figura 1.2 Etapas da formação de biofilme e respectivos fatores ambientais que afetam cada um dos estágios.	9
Figura 1.3 <i>Plocamium cartilagineum</i>	12
Figura 3.1 Porto de Areia Sul, Peniche, Portugal. Autor desconhecido.	14
Figura 3.2 Procedimento de extração da alga <i>Plocamium cartilagineum</i> com os solventes diclorometano e metanol (50:50).	15
Figura 3.3 Procedimento de extração sequencial da alga <i>Plocamium cartilagineum</i> com os solventes etanol e água (70:30), água Milli-Q, éter dietílico, acetato de etilo.	15
Figura 4.1 Efeito do extrato DM e das frações EA, ED, AE e AQ (1mg.mL ⁻¹) da alga <i>Plocamium cartilagineum</i> , no crescimento do fungo <i>Candida albicans</i> . ..	23
Figura 4.2 Efeito do extrato DM e das frações EA, ED, AE e AQ (1mg.mL ⁻¹) da alga <i>Plocamium cartilagineum</i> , no crescimento das bactérias gram-negativas (A) <i>Escherichia coli</i> , (B) <i>Klebsiella pneumoniae</i> e (C) <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	24
Figura 4.3 Efeito do extrato DM e das frações EA, ED, AE e AQ (1mg.mL ⁻¹) da alga <i>Plocamium cartilagineum</i> , no crescimento das bactérias gram-positivas (A) <i>Salmonella enteritidis</i> e (B) <i>Staphylococcus aureus</i>	25
Figura 4.4 Curva dose-resposta (1000 -1 µg/mL) do extrato DM e das frações EA e ED da alga <i>Plocaminum cartilagineum</i> no crescimento de <i>Staphylococcus aureus</i>	25
Figura 4.5 Efeito do extrato DM e das frações EA, ED, AE e AQ (1mg.mL ⁻¹) da alga <i>Plocamium cartilagineum</i> , no crescimento do fungo <i>Malassezia furfur</i>	26
Figura 4.6 Efeito do extrato DM e das frações EA, ED, AE e AQ (1mg.mL ⁻¹) da alga <i>Plocamium cartilagineum</i> , no crescimento das bactérias gram-positivas (A) <i>Cutibacterium acnes</i> e (B) <i>Staphylococcus epidermidis</i>	26
Figura 4.7 Curva dose-resposta (1000 -1 µg/mL) do extrato DM e das frações EA e ED da alga <i>Plocaminum cartilagineum</i> no crescimento de (A) <i>Cutibacterium acnes</i> e (B) <i>Staphylococcus epidermidis</i>	27
Figura 4.8 Efeito do extrato DM e das frações EA, ED, AE e AQ (1mg.mL ⁻¹) da alga <i>Plocamium cartilagineum</i> , no crescimento das bactérias gram-negativas (A) <i>Aeromonas aquoriorum</i> , (B) <i>Aeromonas hydrophila</i> , (C) <i>Edwardsiella tarda</i> e (D) <i>Vibrio anguillarum</i>	28
Figura 4.9 Curva dose-resposta (1000 -1 µg/mL) do extrato DM e das frações EA e ED da alga <i>Plocaminum cartilagineum</i> no crescimento de (A) <i>Edwardsiella tarda</i> e (B) <i>Vibrio anguillarum</i>	29
Figura 4.10 Efeito do extrato (A) DM e da fração (B) EA da alga <i>Plocamium cartilagineum</i> (2000-31,25 µg.mL ⁻¹) na formação de biofilme por <i>Escherichia coli</i>	31
Figura 4.11 Efeito das frações (A) ED e (B) AE da alga <i>Plocamium cartilagineum</i> (2000-31,25 µg.mL ⁻¹) na formação de biofilme por <i>Escherichia coli</i>	32

Figura 4.12 Efeito da fração AQ da alga <i>Plocamium cartilagineum</i> (2000-31,25 µg.mL ⁻¹) na formação de biofilme por <i>Escherichia coli</i>	32
Figura 4.13 Efeito do extrato (A) DM e da fração (B) EA da alga <i>Plocamium cartilagineum</i> (2000-31,25 µg.mL ⁻¹) na formação de biofilme por <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	33
Figura 4.14 Efeito das frações (A) ED e (B) AE da alga <i>Plocamium cartilagineum</i> (2000-31,25 µg.mL ⁻¹) na formação de biofilme por <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	33
Figura 4.15 Efeito da fração AQ da alga <i>Plocamium cartilagineum</i> (2000-31,25 µg.mL ⁻¹) na formação de biofilme por <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	34
Figura 4.16 Efeito do extrato (A) DM e da fração (B) EA da alga <i>Plocamium cartilagineum</i> (2000-31,25 µg.mL ⁻¹) na formação de biofilme por <i>Edwardsiella tarda</i>	34
Figura 4.17 Efeito das frações (A) ED e (B) AE da alga <i>Plocamium cartilagineum</i> (2000-31,25 µg.mL ⁻¹) na formação de biofilme por <i>Edwardsiella tarda</i>	35
Figura 4.18 Efeito da fração AQ da alga <i>Plocamium cartilagineum</i> (2000-31,25 µg.mL ⁻¹) na formação de biofilme por <i>Edwardsiella tarda</i>	35
Figura 4.19 Gel de agarose.	36
Figura 4.20 Avaliação dos danos de membrana plasmática (%), provocados pelo extrato DM e pelas frações EA e ED da alga <i>Plocamium cartilagineum</i> , em <i>Staphylococcus aureus</i> , nas situações A (incubação de 4h, 37 °C em meio de cultura LB) e B [incubação de 4h, 37 °C em solução salina a 0,9% (m/v) de NaCl], nas concentrações de 2xIC ₅₀ , IC ₅₀ e 1/2IC ₅₀	37
Figura 4.21 Avaliação dos danos de membrana plasmática (%), provocados pelo extrato DM e pelas frações EA e ED da alga <i>Plocamium cartilagineum</i> , em <i>Cutibacterium acnes</i> , nas situações A (incubação de 24h, 37 °C em meio de cultura TSB) e B [incubação de 24h, 37 °C em solução salina a 0,9% (m/v) de NaCl], nas concentrações de 2xIC ₅₀ , IC ₅₀ e 1/2IC ₅₀	37
Figura 4.22 Avaliação dos danos de membrana plasmática (%) provocados pelo extrato DM e pelas frações EA e ED da alga <i>Plocamium cartilagineum</i> , em <i>Staphylococcus epidermidis</i> , nas situações A (incubação de 4h, 37 °C em meio de cultura BHI) e B [incubação de 4h, 37 °C em solução salina a 0,9% (m/v) de NaCl], nas concentrações de 2xIC ₅₀ , IC ₅₀ e 1/2IC ₅₀	38
Figura 4.23 Avaliação dos danos de membrana plasmática (%), provocados pelo extrato DM da alga <i>Plocamium cartilagineum</i> , em <i>Edwardsiella tarda</i> , nas situações A (incubação de 4h, 30 °C em meio de cultura TSB) e B [incubação de 4h, 30 °C em solução salina a 0,9% (m/v) de NaCl], nas concentrações de 2xIC ₅₀ , IC ₅₀ e 1/2IC ₅₀	38
Figura 4.24 Avaliação dos danos de membrana plasmática (%), provocados pelo extrato DM e pelas frações EA, ED e AE da alga <i>Plocamium cartilagineum</i> , em <i>Vibrio anguillarum</i> , nas situações A [incubação de 4h, 28 °C em meio de cultura TSB + 1,5% (m/v) de NaCl] e B [incubação de 4h, 28 °C em solução salina a 0,9% (m/v) de NaCl], nas concentrações de 2xIC ₅₀ , IC ₅₀ e 1/2IC ₅₀	39
Figura 4.25 Efeito citotóxico do extrato DM, e das frações EA, AE e ED da alga <i>Plocamium cartilagineum</i> , nas concentrações (µg.mL ⁻¹): 350; 210 e 130 (DM); 210; 70 e 20 (EA); 80 (AE); e 50 (ED), na viabilidade celular das células 3T3 após 8 h de incubação.	40
Figura 4.26 Espectro ¹ H RMN (300 MHz) da fração EA de <i>Plocamium cartilagineum</i>	40

LISTA DE ABREVIATURAS

a.C.: antes de Cristo

AAPH: Dicloreto de 2,2'-Azobis (2-Amidinopropano), do inglês *2,2'-Azobis (2-Amidinopropane) Dihydrochloride*

AE: Fração de Acetato de Etilo proveniente do Extrato de Etanol-Água

AQ: Fração Aquosa proveniente do Extrato de Etanol-Água

BHI: Caldo Cérebro Coração, do inglês *Brain Heart Infusion*

CDC: *Center for Disease Control and Prevention*

CO₂: Dióxido de Carbono

DM: Extrato de Diclorometano-Metanol

DMEM: Meio de Eagle Modificado por Dulbecco, do inglês *Dulbecco's Modified Eagle Medium*

DMSO: Dimetilsulfóxido

DNA: Ácido Desoxirribonucleico, do inglês *deoxyribonucleic acid*

EA: Fração Sólida Apolar do Extrato de Etanol-Água

eDNA: DNA extracelular

ED: Fração de Éter Dietílico proveniente do Extrato de Etanol-Água

EPS: Substância Polimérica Extracelular, do inglês *Extracellular Polymeric Substances*

ESBL: β-Lactamases de Espectro Alargado, do inglês *Extended-Spectrum Beta-Lactamase*

EUA: Estados Unidos da América

FBS: Soro Fetal Bovino, do inglês *Fetal Bovine Serum*

IC₅₀: – Concentração Inibitória de 50% do Crescimento, do inglês *Half Maximal Inhibitory Concentration*

L/L: Partição Líquido-Líquido

LB: Caldo Lisogénico, do inglês *Lysogeny Broth*

LNm: Caldo *Lemming-Notman* modificado

MRSA: *Staphylococcus aureus* Resistentes à Meticilina, do inglês *Methicillin-resistant Staphylococcus aureus*

MTT: Brometo de 3-[4,5-Dimetiltiazol-2-il]-2,5-Difenil Tetrazólio, do inglês 3-[4,5-Dimethylthiazol-2-yl]-2,5-Diphenyl Tetrazolium Bromide

NaCl: Cloreto de Sódio

OMS: Organização Mundial de Saúde

PBS: Tampão Fosfato-Salino, do inglês *Phosphate Buffered Saline*

QQ: *Quorum Quenching*

QS: *Quorum Sensing*

QSI: Inibidores de QS

SEM: Erro-Padrão da Média

T.A.: Temperatura ambiente

TAE: Tampão Tris-Acetato-EDTA

TSB: Caldo Soja Trypticaseína, do inglês *Trypticase Soy Broth*

YPD: Caldo Extrato de Levedura, Peptona e Dextrose, do inglês *Yeast Extract, Peptone, Dextrose*

¹H RMN: Ressonância Magnética Nuclear de Protão

LISTA DE UNIDADES

cm²: centímetro quadrado

g: grama

h: hora

m: metro

mg: miligrama

MHz: mega-hertz

min: minuto

mL: mililitro

mM: micromolar

ng: nanograma

nm: nanómetro

ppm: partes por milhão

rpm: rotações por minuto

S: Svedberg

ufc: unidade formadora de colónias

V: volt

µg: micrograma

µL: microlitro

µm: micrómetro

°C: grau Celsius

INTRODUÇÃO

“Que seu remédio seja seu alimento, e que seu alimento seja seu remédio”, afirmou Hipócrates, historicamente conhecido como o “pai da medicina” (431 a.C.) (Taukoorah *et al.*, 2016). De facto, desde tempos antigos, a natureza demonstrou ser uma fonte importante de substâncias terapêuticas (Amador *et al.*, 2003). O registo mais antigo remonta a fósseis do Neandertal com vestígios do uso de plantas medicinais. O Papiro de Ebers, um dos registos médicos mais importantes do Antigo Egipto (1500 a.C.), documenta cerca de 1000 substâncias e formulações diferentes, a maioria de origem vegetal. A cultura oriental tem, como tradição ancestral, o uso de plantas herbáceas como tratamento das mais diversas patologias, muitas delas ainda utilizadas de uma forma ou de outra no tratamento de inflamações e infeções (Gad, 2005).

As plantas medicinais fazem parte de centenas de milhares de plantas existentes no mundo, que evoluíram ao longo de um extenso período da história biológica e geológica do nosso planeta (Hao *et al.*, 2020). Diferentes tipos de plantas têm sido a base da fitoterapia tradicional, entre diferentes grupos étnicos em todo o mundo, desde tempos imemoriais. Estes produtos de origem vegetal foram identificados e desenvolvidos através do conhecimento popular transmitido de geração em geração entre os povos (Amador *et al.*, 2003; Taukoorah *et al.*, 2016). A nível mundial, as estimativas indicam que 80% da população recorre a produtos de origem vegetal como recurso terapêutico devido à inacessibilidade a terapêuticas provenientes da indústria farmacêutica (Hao *et al.*, 2020).

O conhecimento empírico sobre a utilização de compostos de origem natural tem despertado o interesse da comunidade científica que, cada vez mais, reconhece os produtos naturais como uma fonte importante de novas moléculas que possam inspirar o desenvolvimento de medicamentos inovadores (Fang *et al.*, 2020). Desta forma, podemos definir produtos naturais como compostos químicos com propriedades biológicas produzidos por organismos vivos como plantas, animais e microrganismos (Muhammad *et al.*, 2020). Estes compostos derivam do metabolismo primário ou secundário destes organismos como resposta ao *stress* provocado pelo meio ambiente (Pérez *et al.*, 2016) e possuem uma vasta aplicabilidade nas indústrias farmacêutica, alimentar, cosmética, entre outras (Muhammad *et al.*, 2020). Comparativamente aos compostos sintéticos, os produtos naturais possuem estruturas químicas diversas, com elevado grau estereoquímico e elevada atividade biológica (Fang *et al.*, 2020).

Com os recentes avanços tecnológicos e científicos, particularmente os estudos funcionais e a triagem fenotípica, muitos produtos naturais estão a ser usados atualmente como ponto de partida para o desenvolvimento de novos medicamentos (Fang *et al.*, 2020). Apesar de, tradicionalmente, os produtos naturais estarem maioritariamente associados a compostos provenientes de plantas (Muhammad *et al.*, 2020) e os compostos provenientes de organismos marinhos estejam sub-representados na farmacopeia atual, prevê-se que o ambiente aquático se torne numa fonte inestimável de novos compostos, num futuro próximo. O desenvolvimento de produtos naturais de origem marinha encontra-se numa fase inicial, em comparação com a história e a tradição étnica associada aos produtos de origem vegetal terrestre, muito devido às dificuldades técnicas na colheita de organismos marinhos. No entanto, nas últimas décadas, foram feitos esforços significativos, quer por empresas farmacêuticas quer por instituições académicas, para isolar e identificar novos produtos naturais de origem marinha. Para tal, o progresso nas técnicas de mergulho e instrumentos de colheita em águas profundas foram fatores fundamentais para o sucesso da descoberta de novos produtos naturais de origem marinha. Enquanto há 40 anos a recolha de organismos marinhos estava limitada às espécies que se encontravam em ambientes submarinos rasos, o advento do mergulho permitiu que os investigadores explorassem ambientes submarinos de maiores profundidades. Por outro lado, as colheitas em águas extremamente profundas são agora possíveis através de submersíveis, tripulados ou não (Amador *et al.*, 2003).

1.1 Biodiversidade do ambiente marinho

O planeta Terra, notavelmente azul, é composto por um conjunto de oceanos, interconectados entre si, que dominam a hidrosfera e contêm cerca de 97% da água do planeta. Os oceanos são o berço evolutivo da vida na Terra, que surgiu há bilhões de anos atrás, e ocupam cerca de 70% da área do planeta. Visto do espaço, o planeta é composto por um oceano global que se assemelha a uma série de lóbulos entrelaçados que nós, seres humanos, agrupamos em cinco áreas oceânicas de tamanho descendente: oceanos Pacífico, Atlântico, Índico, Ártico e Antártico. Dentro destes existe um conjunto de mares, golfos e baías de menores dimensões. No entanto, todos eles são o meio para uma diversidade extraordinária da vida marinha (DellaSala, 2018).

Os ambientes marinhos estão entre os ecossistemas mais ricos e complexos. Englobam uma ampla, e ainda desconhecida, diversidade de espécies, diversidade genética e também uma vasta gama de habitats que moldam a presença e as respostas dos organismos (Pintéus *et al.*, 2018). O ecossistema marinho representa 95% da biosfera e 32 dos 33 filos animais estão representados nos ambientes aquáticos. A maioria dos invertebrados sésseis marinhos contém um sistema imunológico primitivo e produzem compostos químicos tóxicos como forma de defesa. O ambiente marinho, constituído por aproximadamente 10^6 bactérias/mL e 10^9 vírus/mL de água de mar, representa um ambiente altamente antagonista. Os organismos marinhos coabitam em comunidades complexas e em estreita associação com outras espécies num ambiente altamente competitivo. Desta forma, organismos sésseis marinhos como algas, esponjas e corais, desenvolveram adaptações fisiológicas como resposta às pressões ecológicas e físicas. Estes organismos produzem metabolitos secundários complexos que atuam como reguladores de funções biológicas específicas. Estes metabolitos ficam imediatamente diluídos por grandes volumes de água do mar e, como tal, necessitam ser altamente potentes e ter uma solubilidade relativamente baixa. Desta forma, os compostos produzidos apresentam diversas atividades biológicas as quais poderão ter potencial para o desenvolvimento de novos fármacos, com diversas aplicabilidades terapêuticas (Amador *et al.*, 2003; Falanga *et al.*, 2016; Pérez *et al.*, 2016).

1.1.1 Algas como fonte de compostos bioativos

As algas são um dos recursos mais abundantes nos oceanos (Xu *et al.*, 2017), no entanto, podem ser encontradas também em rios, lagos e solos ou como simbioses em animais e plantas. Existem mais de 30 000 espécies de algas, que englobam quer microalgas quer macroalgas (Al-Enazi *et al.*, 2018). As macroalgas são vulgarmente conhecidas como algas marinhas. À semelhança de outros organismos marinhos, as algas desenvolvem, como mecanismo de defesa, estratégias metabólicas para sobreviver em ambientes adversos e em constante mudança. Desta forma, produzem metabolitos secundários que, à semelhança dos metabolitos primários, possuem uma distribuição taxonómica restrita, limitada muitas das vezes a uma espécie ou género específico. As macroalgas apresentam uma elevada plasticidade, quer fisiológica quer morfológica, que lhes permite adaptarem-se a novas condições ambientais. Esta forte adaptação permite a produção de metabolitos diferentes, mesmo dentro da mesma espécie. Esta característica única torna as macroalgas os candidatos ideais para a triagem de novos compostos e outros já conhecidos com potencial bioativo com aplicabilidade nas indústrias farmacêutica, cosmética, química e alimentar, com o desenvolvimento de produtos sustentáveis, económicos e ecológicos (Pintéus *et al.*, 2018).

A nível celular, as algas diferem na sua estrutura e pigmentação fotossintética de espécie para espécie. De acordo com as diferentes pigmentações, as macroalgas são divididas em três filos diferentes: *Chlorophyta*, *Heterokontophyta* e *Rhodophyta*. As algas *Chlorophyta* ou algas verdes são um grupo diversificado, existente em diferentes habitats: marinho, de água doce e terrestre; caracterizam-se pela predominância de dois pigmentos fotossintéticos, a clorofila *a* e a clorofila *b*. As algas *Heterokontophyta*

ou algas castanhas habitam quase exclusivamente o ambiente marinho, existindo menos de 1% em habitats de água doce; caracterizam-se pela predominância dos pigmentos xantofila e fucoxantina, que mascaram as clorofilas *a* e *c*, conferindo-lhes uma tonalidade escura. Por fim, as algas *Rhodophyta* ou algas vermelhas habitam, também, quase exclusivamente no ambiente marinho, existindo menos de 3% em habitats de água doce; caracterizam-se pela predominância dos pigmentos ficoeritrina e ficocianina (Zerrifi *et al.*, 2018).

Até ao momento, diferentes tipos de metabolitos secundários foram identificados, nos quais se incluem: terpenóides, alcalóides, policetídeos, peptídeos, açúcares, esteróides, compostos halogenados, lectinas, lípidos, pigmentos, entre outros. Estes metabolitos possuem um potencial bioativo elevado e diversificado. De entre a grande variedade de funções biológicas dos compostos e metabolitos naturais com origem em algas podemos destacar as atividades: antibacteriana, antifúngica, antiviral, anticancerígena, antioxidante, anti-inflamatória, anticoagulante, ansiolítica, entre outras, com uma vasta aplicabilidade nas indústrias farmacêutica, alimentar, cosmética, nutracêutica e biomedicina (Alves *et al.*, 2018; Pérez *et al.*, 2016; Souza *et al.*, 2018).

1.2 A importância do desenvolvimento de novos antimicrobianos e o seu papel na saúde pública

A história da Humanidade pode ser vista e analisada através da cronologia das doenças infecciosas. Desde tempos primórdios, as doenças infecciosas tiveram um papel preponderante na alteração dos ciclos políticos, económicos e geográficos (Munita *et al.*, 2016). Acidentalmente, em 1928, Alexander Fleming alterou o panorama das doenças infecciosas e, por conseguinte, a resposta terapêutica da medicina ao descobrir, através do fungo *Penicillium notatum*, o primeiro antibiótico – a penicilina (Cunha, 2004).

Os antibióticos são compostos naturais, semissintéticos e/ou sintéticos que podem inibir ou eliminar o crescimento de bactérias, tendo por isso uma atividade bacteriostática ou bactericida. Estes medicamentos são administrados por via oral, parental ou tópica, sendo usados quer na medicina humana quer na medicina veterinária. Existem atualmente cerca de 250 entidades químicas registadas para o seu uso. Caracterizam-se, na sua grande maioria, por serem moléculas complexas, com toxicidade seletiva e que podem possuir diferentes funções dentro da mesma molécula. Assim, perante condições de pH, os antibióticos podem ser neutros, catiónicos, aniónicos ou zwitteriónicos. Podem ainda serem agrupados pela sua estrutura química, espectro de atuação ou mecanismos de ação. Encontram-se divididos em subgrupos como β -lactâmicos, anfenicóis, tetraciclina, macrolídeos, aminoglicosídeos, fluoroquinolonas, entre outros (Menkem *et al.*, 2018).

Apesar de terem sido uma das descobertas com maior sucesso no último século, desde cedo tornou-se evidente que as bactérias poder-se-iam tornar resistentes aos antibióticos. Contudo, durante algumas décadas, este problema foi mitigado pela constante introdução de novos antibióticos pela indústria farmacêutica. Nos últimos anos, verificou-se uma diminuição drástica na descoberta de novas moléculas e, por conseguinte, a prevalência de bactérias resistentes a antibióticos aumentou. A resistência a antimicrobianos é um problema de saúde pública e pode afetar a saúde humana em dois níveis: no primeiro, pode ter efeito direto na possibilidade de tratar infeções; no segundo, pode comprometer tratamentos que requerem imunossupressão, tais como transplantes e quimioterapia, ou procedimentos, como intubações ou cateterizações. A resistência aos antibióticos pode ser definida como a capacidade de um microrganismo resistir aos efeitos de um antibiótico. De um ponto de vista operacional, esta definição permite classificar as bactérias como resistentes ou suscetíveis, com base na possibilidade de o antibiótico tratar as infeções por elas produzidas. Clinicamente, um microrganismo é definido como suscetível por um nível de atividade antimicrobiana associado a uma alta probabilidade de sucesso terapêutico e, por sua vez, é definido como resistente por um nível de atividade

antimicrobiana associada a uma alta probabilidade de falha terapêutica. Estas definições têm como base a farmacodinâmica e a farmacocinética dos antibióticos e antimicóticos ao estabelecer as concentrações necessárias para erradicar a infecção no corpo humano (Martinez, 2014; Goossens *et al.*, 2005).

1.2.1 Resistência a antimicrobianos: principais considerações

Na presença de um antimicrobiano, as bactérias podem apresentar três fenótipos fundamentais: suscetibilidade, resistência intrínseca ou resistência adquirida. A resistência intrínseca é natural para todos os membros de uma espécie e é resultante da composição bioquímica do microrganismo. Este tipo de resistência restringe o espectro de atividade de um antibiótico. Por outro lado, a resistência adquirida resulta de alterações genéticas e encontra-se presente, geralmente, em grupos isolados de determinadas estirpes ou espécies. A resistência adquirida pode ser vista como o resultado da incrível plasticidade genética que as bactérias possuem, que permite responder a uma ampla gama de ameaças ambientais, nas quais se incluem a presença de moléculas antibióticas. A partilha de nichos ecológicos entre bactérias e organismos produtores de antimicrobianos permitiu a estas adquirirem mecanismos de resistência, de forma a prosperar na presença destes organismos (McDermott *et al.*, 2003).

Numa perspetiva evolutiva, as bactérias usam duas estratégias genéticas para se adaptarem a um “ataque” antibiótico: mutação e transferência horizontal de genes. Na estratégia da mutação, um subconjunto de células bacterianas derivadas de uma população suscetível desenvolve mutações em genes que afetam a atividade do medicamento. Como resultado, a bactéria consegue sobreviver na presença do antibiótico. Por conseguinte, surge uma bactéria mutante resistente: o antibiótico consegue eliminar a população suscetível, mas a população mutante persiste. Há a salvaguardar que muitas das vezes estas mudanças genéticas nas bactérias levam a uma diminuição do *fitness*, sendo apenas mantidas na presença do antibiótico. De uma forma geral, as mutações que resultam em resistência antimicrobiana ocorrem nos genes que permitem alterar os seguintes mecanismos: modificações nos alvos antimicrobianos (diminuição da afinidade pela droga); diminuição da absorção da droga; ativação dos mecanismos de efluxo (bombas) para expulsar as moléculas antimicrobianas e, por fim, mudanças globais nas principais vias metabólicas reguladoras. Na estratégia da transferência horizontal de genes, as bactérias compartilham, entre estirpes e espécies diferentes, material genético [ácido desoxirribonucleico (DNA)] “estranho”. A grande parte deste material genético compartilhado é encontrado naturalmente no meio ambiente, existindo cada vez mais evidências de que este *environmental resistome* é uma fonte prolífera de aquisição de genes de resistência a antibióticos em bactérias clinicamente relevantes. Classicamente, as bactérias adquirem material genético externo através de três estratégias: transformação (incorporação de DNA), transdução (fago-mediada) e conjugação (recombinação genética entre bactérias, sem geração de descendentes) (Munita *et al.*, 2016). Em suma, as bactérias podem resistir às terapias antimicrobianas, principalmente, por quatro mecanismos de resistência: (i) produção de enzimas com capacidade de degradação ou inativação dos antibióticos, como as β -lactamases; (ii) bombas de efluxo que expelirão os antibióticos e restringirão o acesso do antibiótico ao alvo; (iii) modificação do local-alvo do antibiótico e, por último, (iv) perda de ativação do antibiótico (Martinez, 2014).

As principais famílias de antibióticos descritos e disponíveis atualmente enquadram-se em cinco categorias principais, tendo por base o alvo ou mecanismo de ação: (i) síntese do peptidoglicano, (ii) estruturas das membranas celulares, (iii) síntese proteica, (iv) ácidos nucleicos e (v) síntese de folatos (McDermott *et al.*, 2003; Kohanski *et al.*, 2010; Dowling *et al.*, 2017).

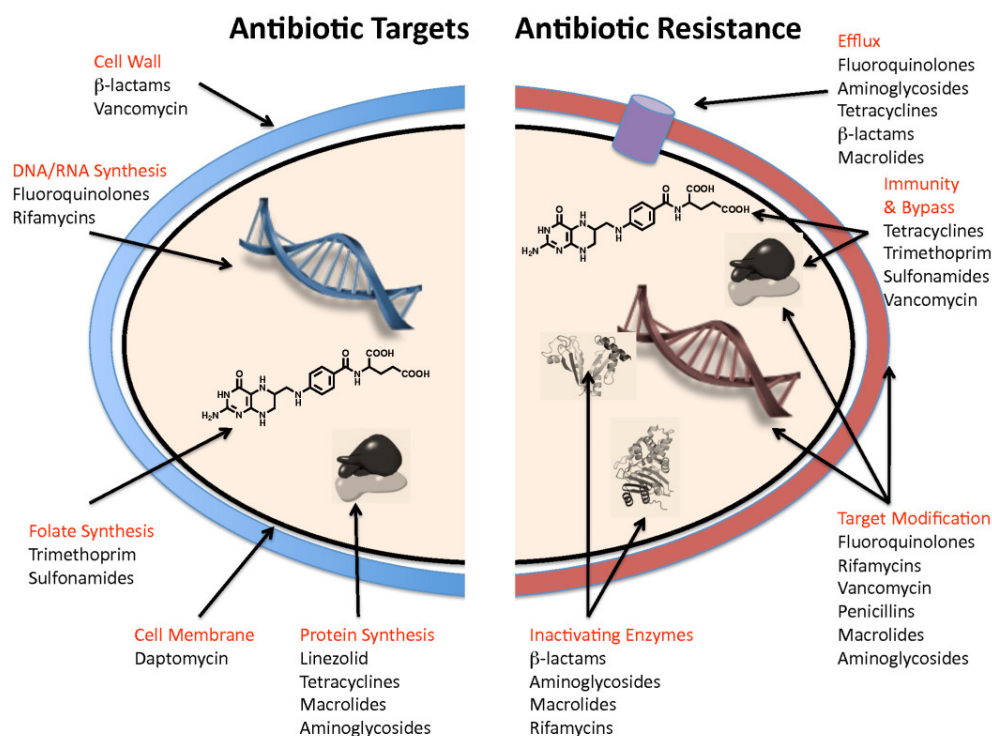


Figura 1.1 Alvos celulares das principais famílias de antibióticos (azul); e mecanismos bacterianos de resistência a antibióticos (vermelho). Autor: Gerard D. Wright. Fonte: <https://bmcbiol.biomedcentral.com>. Acedido a 10 de fevereiro de 2021.

Os principais fatores que contribuem para o desenvolvimento de resistência a antimicrobianos incluem a exposição prolongada a antibióticos, através do seu uso como medicamento em humanos e, por outro lado, o seu uso em animais, principalmente como promotores de crescimento. Nos últimos anos, o uso de antibióticos foi além da vertente terapêutica. Enormes quantidades de antibióticos são utilizadas em aquaculturas, na indústria pecuária, cunícola e avícola para melhorar o desempenho no crescimento e a eficiência alimentar, para sincronizar e/ou controlar o ciclo e o desempenho reprodutivo, com efeitos residuais prejudiciais para a saúde humana e ambiente ainda não totalmente conhecidos. O mecanismo de ação dos antibióticos, como promotores de crescimento, está relacionado com as interações entre os antibióticos e a microbiota intestinal: pequenas doses de antibióticos são adicionadas às rações de bovinos, suínos, coelhos e aves com o intuito de aumentar o tamanho corporal. Por outro lado, o uso de antibióticos como profilaxia nesta indústria é um outro uso que tem vindo a aumentar. Este uso indiscriminado de antibióticos em animais pode ter efeitos diretos e indiretos na saúde humana, principalmente pelo desenvolvimento de estirpes resistentes. Para além destes fatores podemos incluir ainda a concentração do medicamento, a duração da exposição, o tipo de organismos, o tipo de antimicrobiano e o estado imunológico do hospedeiro, como fatores promotores de resistência (Menkem *et al.*, 2018).

O *Center for Disease Control and Prevention* (CDC) estima que 30% a 50% das prescrições de antibióticos em doentes em ambulatório são desnecessárias e que cerca de 30% dos antibióticos usados em hospitais são dispensáveis ou prescritos incorretamente. O CDC estima, também, que as bactérias resistentes a antibióticos causam, só nos Estados Unidos da América (EUA), mais de dois milhões de doentes por ano, dos quais 23 000 resultam em mortes, enquanto que, na Europa, este número aumenta para 25 000 mortes por ano. As taxas de uso de antibióticos em hospitais, nos EUA, permaneceram estáveis de 2006 a 2012, mas o uso de antibióticos de alta potência aumentou em 40% para carbapenems e em 30% para vancomicina (Morehead *et al.*, 2018). A Organização Mundial de Saúde (OMS) apontou

a resistência aos antimicrobianos como uma das três ameaças mais importantes do século XXI (WHO, 2014).

1.2.2 Resistências a antimicrobianos e implicações na prática clínica humana

O aumento de microrganismos multirresistentes, com poucas opções de tratamento e muitas vezes ineficazes, é uma das grandes preocupações por parte dos clínicos e dos responsáveis em saúde pública. Uma das espécies mais problemáticas é *Staphylococcus aureus* (Al-Haj *et al.*, 2010), que continua a ser um exemplo protótipo histórico de resistência. *S. aureus* rapidamente se tornou numa espécie bacteriana multirresistente: iniciou na década de 1940, com a resistência à penicilina, através de penicilinase; em seguida, na década de 1950, tornou-se resistente a macrolídeos e à tetraciclina e, finalmente, na década de 1960 tornou-se resistente à meticilina. Estima-se que 20% da população mundial é portadora persistente de *S. aureus* e que nos EUA morram anualmente cerca de 19 000 pessoas por ano devido a infeções por *S. aureus* resistentes à meticilina (MRSA) (Morehead *et al.*, 2018).

Staphylococcus aureus apresenta-se como um coco gram-positivo, pertencente à família *Micrococcaceae*, imóvel, com cerca de 0,5 a 1 µm. Caracteriza-se por ser anaeróbio facultativo e mesófilo, com uma temperatura de crescimento ótima entre os 30 °C e os 37 °C (Araújo *et al.*, 2016). O CDC estima que 7% da população dos EUA seja colonizada com *S. aureus* através das narinas. As infeções por MRSA, adquiridas na comunidade, envolvem mais frequentemente a pele, mas também pode causar outras patologias como pneumonia necrosante grave, infeção urinária, fascite, meningite, flebite, entre outras. A nível nosocomial, as infeções por MRSA são causadoras de bacteriemia, endocardite, osteomielite, celulite e pneumonia, sendo também uma das principais causas de infeção em dispositivos médicos. Contudo, em dados recentes, verificou-se uma diminuição significativa das infeções invasivas nosocomiais por MRSA. No entanto, na última década, a taxa de infeções por MRSA na comunidade aumentaram, estando aparentemente a estagnar na atualidade. Apesar de MRSA ser um dos principais causadores das infeções resistentes a antibióticos, o CDC categorizou-o como uma ameaça grave e não uma ameaça urgente. Esta classificação baseou-se no número decrescente de infeções invasivas e na existência de vários antibióticos eficazes no tratamento. No entanto, o tratamento de infeção por MRSA em ambiente hospitalar, utiliza novas opções, economicamente dispendiosas, como a daptomicina, a linezolida ou vancomicina, que requerem uma monitorização significativa, pois apresentam elevados riscos de reações adversas (Knaack *et al.*, 2019; Morehead *et al.*, 2018; Pintéus *et al.*, 2018).

Algumas estirpes de *S. aureus* têm a capacidade de produzir enterotoxinas termoestáveis como fator de virulência. As toxinas produzidas têm a capacidade de provocar toxinfecção em humanos, nas quais se podem destacar as intoxicações alimentares. Na indústria alimentar, aquando da confeção de alimentos, se existirem más práticas de higiene e segurança alimentar, *S. aureus* tem a capacidade de se manter à temperatura ambiente e produzir enterotoxinas que serão resistentes quer às elevadas temperaturas de confeção dos alimentos quer às baixas temperaturas de refrigeração e conservação (Loir *et al.*, 2003).

As facilidades de movimento das pessoas a nível global, devido ao aumento do número de viagens, facilitaram a disseminação de bactérias gram-negativas multirresistentes. As pessoas que visitam outras regiões geográficas, “transportam” consigo bactérias colonizadas e patogénicas na sua flora gastrointestinal, expondo as populações ao redor do mundo. Nessas transferências gastrointestinais, a família *Enterobacteriaceae* é uma das mais importantes, no qual podemos destacar as espécies *Escherichia coli* e *Klebsiella* spp. Estas bactérias possuem um genoma fluído, permitindo a transferência, mediada por plasmídeos, de genes de resistência a antibióticos para outras espécies e ambientes. Outros fatores que contribuem para esta disseminação são o saneamento e higiene deficiente, associado muitas vezes à falta de água potável e à dificuldade de eliminação destes genes em sistemas de esgotos altamente eficientes. Estas bactérias são resistentes a quase todas as penicilinas e

cefalosporinas, existindo, por vezes, como única solução de tratamento os carbapenems. Enterobactérias produtoras de β -lactamases de espectro alargado (ESBL) são responsáveis por 19% das infeções nosocomiais por *E. coli* e *Klebsiella*. A infeção multirresistente por *E. coli* é especialmente preocupante, pois é a infeção bacteriana gram-negativa mais comum em humanos. A multirresistência a antibióticos de *E. coli* continua-se a expandir, levando à utilização de antibióticos de última linha. *E. coli* é causadora de infeções do foro intestinal, como a diarreia e a colite hemorrágica e infeções urinárias, entre outras doenças. À semelhança de *S. aureus*, *E. coli* pode provocar doença, tendo como veículo de propagação os alimentos (Morehead *et al.*, 2018; Jang *et al.*, 2017).

Salmonella spp. é uma espécie bacteriana amplamente distribuída, referenciada também pela OMS, como uma das espécies multirresistentes a antibióticos. As doenças causadas por *Salmonella* spp. são de foro diarreico, ocorrendo por meio de alimentos e fontes de água contaminados ou por meio do contato direto com fezes ou animais infetados. Quer *Salmonella* não-tifóide quer *Salmonella typhi* possuem resistência a diversos antibióticos, como a ciprofloxacina e a azitromicina. O uso excessivo e inadequado de antibióticos para infeções leves, assim como a sua disseminação em alimentos e água, são os fatores causais de resistência a antibióticos em infeções diarreicas (WHO, 2014).

1.2.3 Resistências a antimicrobianos na atividade veterinária – a aquacultura

No contexto de saúde pública, a importância da descoberta de novos antimicrobianos não se pode restringir somente à prática clínica humana. Cada vez mais, tem de existir a perceção que humanos e animais vivem em paralelo e interligados, quer na partilha de habitats quer em cadeias alimentares. Desta forma, novas soluções antimicrobianas são necessárias para controlo veterinário das indústrias alimentares e agropecuárias.

A mudança de hábitos dos consumidores associada a uma emergência alimentar mundial revolucionou drasticamente a indústria da aquacultura nas últimas duas décadas. A aquacultura pode ser definida como a produção de organismos aquáticos: peixes, moluscos, crustáceos, anfíbios e plantas, em ambiente aquático confinado (Korostynska *et al.*, 2016). A aquacultura é o setor da indústria de produção alimentar que mais cresce no mundo. Desde 1970, a taxa de crescimento média anual é de 8,9%, enquanto que, no mesmo período, na pesca de captura a respetiva taxa é de 1,2% e na criação de animais de 2,8%. Na década de 50, a produção de peixes em aquacultura era inferior a um milhão de toneladas, no entanto, atingiu as 59,9 milhões de toneladas em 2010, com um valor total estimado de 11,9 bilhões de dólares americanos. Relativamente aos países que mais contribuíram para este aumento, a China tem um papel importantíssimo, tornando-se no primeiro país em que a aquacultura produz mais pescado do que o obtido na pesca de captura. Dados de 2010, referenciam a Ásia como o continente responsável por 89% da produção mundial, tendo a China contribuído para 60% desse valor (Xu *et al.*, 2013).

À semelhança do que ocorre na produção de animais para alimentação, o problema da resistência antimicrobiana também surgiu na aquacultura. Apesar de muitos países terem adotado regulamentação e medidas de controlo, o problema da resistência antimicrobiana em aquacultura necessita de uma introspeção nos países em desenvolvimento, onde a aquacultura intensiva, menos regulamentada e menos controlada, ganhou um grande impulso nos últimos anos, principalmente na região da Ásia e Pacífico (Smith, 2008).

Na aquacultura, salvo raras exceções, não é possível administrar medicamentos individualmente. Como tal, os medicamentos, nos quais se incluem os antibióticos, são administrados de forma massiva na água de cultura. Esta prática apresenta consequentes impactos sobre o meio ambiente, devido principalmente à libertação de resíduos orgânicos e inorgânicos. Fomenta ainda a exposição desnecessária a antibióticos a organismos não-alvo, promovendo o aumento da resistência antimicrobiana e toxicidade, aumentando os riscos de segurança alimentar. Em sistemas de aquacultura abertos, devido ao cariz deste tipo de sistema, o uso de antimicrobianos é baixo. No entanto, atividades

antropogênicas promovem o aparecimento de genes de resistência a antimicrobianos, nas quais se podem incluir as descargas dos dejetos de pecuárias e tratamento de esgotos insuficiente, por exemplo. Todas estas ações promovem a contaminação das águas com metabolitos residuais, deteriorando a sua qualidade e promovendo o aparecimento de microrganismos patogênicos multirresistentes. Para combater este problema, em países com pouco ou ausente controlo e regulamentação, os antibióticos são administrados profilaticamente como forma de evitar o aparecimento de surtos infecciosos em peixes. Em países mais desenvolvidos, onde a aquacultura se desenvolve essencialmente em sistemas fechados, os tanques não são drenados regularmente, o que promove a acumulação de resíduos de antibióticos, promovendo o aparecimento de patogênicos resistentes. O uso de antimicrobianos e a sua eficácia em aquacultura depende de vários fatores, como as doenças infecciosas existentes no sistema de cultivo específico, diversidade de patogênicos, a sensibilidade destes a antimicrobianos, a qualidade da água (salinidade, temperatura, fotoperíodo, entre outros). No entanto, é importante ter ciente que, quer o sistema aberto quer o fechado de aquacultura pode ser considerado um *hotspot* de genes de resistência antimicrobiana pelo que foi anteriormente mencionado (Korostynska *et al.*, 2016; Samanta *et al.*, 2020; Gastalho *et al.*, 2014).

O aparecimento e o aumento de resistências a antimicrobianos em microrganismos patogênicos de peixes surge assim, naturalmente, como resposta evolutiva dos microrganismos, através de mutações, quando expostos a elevadas concentrações de antibióticos ou a uma transferência horizontal de genes existentes no ambiente de aquacultura. Por conseguinte, doenças infecciosas persistem neste contexto, não sendo tratadas. Como resultado, a produção de peixes é comprometida, tendo um prejuízo económico associado, ou vendida comercialmente em regiões geográficas não controladas e promovendo o aparecimento de zoonoses.

Dentro dos microrganismos patogênicos de peixes, *Edwardsiella tarda* possui um papel importante na aquacultura. *E. tarda* é um patogénico de peixes gram-negativo responsável por causar septicemia hemorrágica, designada por *edwardsiellosis*. Esta patologia é frequentemente associada a uma má qualidade das águas e *stress*, causando elevada mortalidade em muitas espécies comercialmente valorizadas como o salmão, a solha, o pregado e o peixe-gato. Yu *et al.* (2012) verificaram a existência de uma estirpe virulenta, *E. tarda* CK 41, que possui genes de resistência a antibióticos, codificados por plasmídeos, que apresenta resistência a pelo menos três antibióticos: canamicina, tetraciclina e estreptomicina.

1.3 Biofilme no contexto das resistências a antimicrobianos

Na década de 1970, e de acordo com as obras de Robert Koch (Blevins *et al.*, 2010), as bactérias eram vistas como microrganismos únicos de flutuação livre. A partir do modelo de cultura bacteriana planctónica pura, cientistas desenvolveram imensos estudos sobre uma enorme diversidade de bactérias patogénicas e foram desenvolvidos antimicrobianos para as eliminar. O surgimento de bactérias resistentes a antimicrobianos e a dificuldade em eliminar determinadas bactérias levou a uma reavaliação do estilo de vida bacteriano. Essa reavaliação permitiu reconhecer a agregação de bactérias dentro de matrizes autoproduzidas, os biofilmes. No entanto, a primeira observação de biofilmes remonta a 1684, quando Antoine van Leewenhoek observou no seu microscópio placa dentária e a descreveu como caspa. Contudo, só em 1977, os cientistas começaram a perceber que algumas bactérias sésseis estavam intimamente relacionadas com alguns estados fisiopatológicos, tais como agregações de *Pseudomonas aeruginosa* na expetoração de doentes com fibrose quística. O termo biofilme foi introduzido formalmente em 1978, por Costerton (Rabin *et al.*, 2015), e pode ser definido como o conjunto formado por uma ou mais espécies de microrganismos aderentes entre si e a superfície biótica e/ou abiótica, incorporados numa matriz extracelular segregada pelos próprios microrganismos (Solano *et al.*, 2014). Destacam-se como exemplos de superfícies abióticas, os cateteres utilizados em

tratamentos médicos ou mesmo os biomateriais, e de superfícies bióticas, o epitélio pulmonar no caso da fibrose quística (Fricks-Lima *et al.*, 2011).

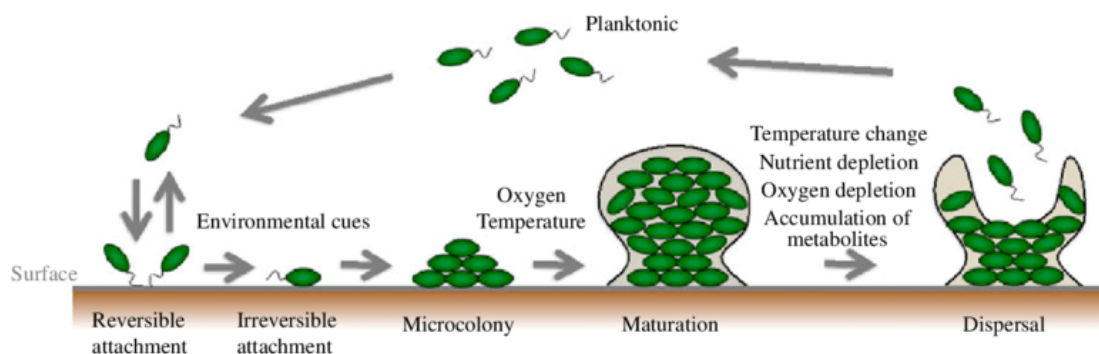


Figura 1.2 Etapas da formação de biofilme e respectivos fatores ambientais que afetam cada um dos estágios. Autor: Masanori Toyofuku. Fonte: <https://doi.org/10.1080/09168451.2015.1058701>. Acedido a 10 de fevereiro de 2021.

O pré-requisito para a formação de biofilme é a proximidade entre a bactéria e uma superfície biótica e/ou abiótica. Os microrganismos representam cerca de 10% da constituição do biofilme, e podem englobar diversas espécies microbianas, desde vírus, a fungos, protozoários e bactérias. A formação do biofilme inclui quatro estágios: (i) fixação inicial dos microrganismos a uma superfície ou entre si, (ii) formação de microcolônias, (iii) maturação do biofilme e, por fim (iv) a dispersão do biofilme. Os diferentes estágios incluem uma fisiologia bacteriana e resposta fenotípica característica, que sugere uma biologia única, não verificada em bactérias planctônicas (Tolker-Nielsen, 2015; MENOITA *et al.*, 2012). Para a formação do biofilme, é essencial que o processo inicial de adesão bacteriana, quer a uma superfície biótica quer a uma superfície abiótica, tenha sucesso. Desta forma, este processo pode ser reversível, caso os microrganismos regressem à forma planctônica ou irreversível se, efetivamente, se desenvolver a formação de biofilme. Para a adesão bacteriana é fundamental a intervenção de várias adesinas, tais como flagelos e fimbrias IV de células hospedeiras, que são importantes na mobilidade *swimming* e *twitching*, respetivamente. O contato inicial das bactérias à superfície ocorre quer pelo movimento *browniano* (onde ocorre um deslocamento aleatório das bactérias num meio) quer pelo modo dirigido, através de quimiotaxia e motilidade (pelos flagelos e pili). Ocorre uma interação inicial entre bactéria planctônica e superfície que podem ser ligações electrostáticas, por hidrogénio, ácido-base, forças de *Van der Waals*, hidrofóbicas, electrostáticas e adesinas. A adesão bacteriana resulta da conexão entre bactéria, superfície (biótica e/ou abiótica) e microambiente em que os microrganismos se encontram. No terceiro estágio, na maturação celular, as células bacterianas começam a formar pequenos agregados celulares, onde ocorre *Quorum Sensing* (QS). O QS caracteriza-se por um mecanismo de comunicação bacteriano, onde há a produção e difusão de pequenas moléculas químicas ou sinalizadoras. Este mecanismo torna-se responsável pela coordenação do comportamento bacteriano relativamente ao meio ambiente, através da regulação de genes especializados, em resposta à densidade populacional (Baton *et al.*, 2015; Trentin *et al.*, 2013; Lazar, 2011).

A formação de biofilme é uma das estratégias de sobrevivência que permitem aos microrganismos habitarem com sucesso diversos ambientes. Estruturalmente, o biofilme é composto por uma matriz de componentes poliméricos. A matriz é composta maioritariamente por substância polimérica extracelular (EPS) (com um ou mais exopolissacarídeos), por proteínas extracelulares e DNA extracelular (eDNA) (Huang *et al.*, 2019). A alternância, entre a forma planctônica e o biofilme sésil, é uma realidade em muitas bactérias. A forma planctônica tem taxas de crescimento celular e de reprodução relativamente altas, enquanto que o biofilme demonstra ser um estado menos ativo. A formação de biofilme permite uma tolerância das bactérias a condições ambientais adversas e /ou

proteção, principalmente as camadas mais profundas, a agentes antimicrobianos, onde se cria um ambiente ótimo para a troca de eDNA (por conjugação, através de plasmídeos) (Rabin *et al.*, 2015).

No quarto e último estágio da formação de biofilme, a dispersão do biofilme envolve a disseminação das células bacterianas (individualmente ou em grupo) a partir de um biofilme para o ambiente em redor, constituindo um fator importante na disseminação de uma infecção em contexto clínico. Esta dispersão pode ocorrer por dois processos independentes: a erosão e a descamação. No primeiro, ocorre um desprendimento contínuo de uma única célula bacteriana ou de pequenas porções de biofilme, podendo ser afetada por diversos fatores, enquanto que, no segundo, ocorre uma perda rápida e maciça do biofilme (Stoodley *et al.*, 2001; Stoodley *et al.*, 2002).

Nos últimos anos, o biofilme tem despertado o interesse clínico devido à sua formação por bactérias clinicamente relevantes e que causam elevada mortalidade, designadas por ESKAPE (*Enterococcus faecalis*, *Staphylococcus aureus*, *Klebsiella pneumoniae*, *Acinetobacter baumannii*, *Pseudomonas aeruginosa* e *Enterobacter* spp.) (Rabin *et al.*, 2015).

Os biofilmes são encontrados na síndrome do intestino irritável, membranas timpânicas, feridas crónicas, infeções, osteomielite, placa dentária, infeções pulmonares, amigdalite, implantes, válvulas cardíacas artificiais, lentes de contacto e em todos os tipos de cateteres internos. As infeções agudas geralmente envolvem as formas planctónicas das bactérias, no entanto, aquando da formação de biofilme, a infeção evolui para crónica e resistente a antimicrobianos, aumentando a morbilidade e mortalidade do paciente.

Pseudomonas aeruginosa pode ser apelidada de bactéria modelo para a formação de biofilme, pois coloniza eficientemente diferentes superfícies causando infeções crónicas difíceis de erradicar. Trata-se de uma bactéria gram-negativa, patogénica para os humanos, oportunista, que causa doença grave, principalmente em pacientes com fibrose quística. A virulência desta bactéria agrava devido à sua capacidade de formação de biofilme, o que a tornou resistente a vários antibióticos: fluoroquinolonas, ciprofloxacina, levofloxacina, gentamicina, entre outros (Brindhadevi *et al.*, 2020).

1.4 Os microrganismos e a indústria dermocosmética

A pele, o maior órgão do corpo humano, é uma barreira epitelial ao meio externo que se mantém em constante contato com o meio ambiente. De forma a proteger o organismo de infeções e penetração de agentes tóxicos, a pele está envolvida numa variedade de estratégias defensivas: barreiras físicas, microbiológicas e químicas, possuindo células imunes residentes que funcionam como “sentinelas” e que contribuem para a homeostase do tecido (Nguyen *et al.*, 2019). No útero materno, a pele é estéril. No momento do parto e após o nascimento, o recém-nascido começa a contactar quer com a microbiota vaginal da mãe quer com os microrganismos ambientais que rapidamente começam a colonizar o estrato córneo. Neste momento, desenvolve-se um ecossistema microbiano complexo que se encontra em homeostase com o seu hospedeiro. Estima-se que cerca de um milhão de microrganismos, num total de 100 espécies distintas, colonizam cada centímetro quadrado de pele humana. A diversidade da microbiota da pele é determinada por diversos fatores, tais como: características ambientais, dados demográficos, estilo de vida, predisposição genética, entre outros (Zeeuwen *et al.*, 2013).

A microbiota da pele, composta por bactérias, fungos e vírus, é adaptada para a vida nos microhabitats únicos que definem o ambiente e as condições nutricionais deste “ecossistema”. A pele oferece nichos de proteção, assim como nutrientes necessários para a sobrevivência, competição e cooperação dos microrganismos. A uma escala microscópica, a unidade pilosebácea é uma invaginação protetora que fornece um ambiente microaerofílico para anaeróbios obrigatórios e facultativos. Por outro lado, a uma escala macroscópica, dobras como o umbigo fornecem um ambiente húmido, que retém a humidade, e resiste a perturbações externas. O sebo, secretado pelas glândulas sebáceas, é uma fonte de lípidos que pode ser utilizada como fonte de nutrientes (Flowers *et al.*, 2020).

A microbiota presente na pele pode ser transitória ou residente. A primeira corresponde a microrganismos do ambiente que habitam temporariamente a pele, enquanto que os últimos correspondem aos microrganismos comensais da pele. A diversidade, quer de microrganismos residentes quer transitórios, depende da região topográfica do corpo, que tem características próprias (pH, humidade, salinidade, teor sebáceo), de fatores intrínsecos (idade, genótipo, sexo) e fatores extrínsecos individuais (estilo de vida, localização geográfica, uso de antibióticos e cosméticos (Zeeuwen *et al.*, 2013).

A microbiota residente é composta essencialmente por três géneros de bactérias: *Corynebacteria*, *Propionibacteria* e *Staphylococcus*, na qual a sua interação é essencial para a manutenção de uma pele saudável. *Cutibacterium acnes* e *Staphylococcus epidermidis* são duas das principais espécies bacterianas. *Cutibacterium acnes* desempenha um papel importante na saúde da pele, ao degradar triglicéridos com a conseguinte libertação de ácidos gordos, de forma a manter baixo o pH da pele. Inibe também a colonização de patógenos, no entanto, em situações de desequilíbrio homeostático, algumas estirpes de *C. acnes* tornam-se patógenos oportunistas, contribuindo para o processo inflamatório crónico de *acnes vulgaris* (Dréno *et al.*, 2018). *Staphylococcus epidermidis* é, geralmente, considerado um microrganismo comensal, pertencente ao grupo de *Staphylococcus* coagulase negativo que, tendo uma escassa virulência, são considerados menos invasivos que os coagulase positiva (*S. aureus*). No entanto, recentemente, *S. epidermidis* tornou-se um patógeno nosocomial frequente e importante, principalmente em indivíduos imunocomprometidos. Caracterizam-se por colonizar dispositivos médicos implantados, em particular dispositivos intravasculares, próteses articulares, substitutos de válvulas cardíacas e lentes oculares. A colonização deste tipo de dispositivos médicos pode progredir de infeções subagudas a crónicas, podendo ocorrer bacteremia. As estirpes nosocomiais de *S. epidermidis* têm demonstrado uma elevada multirresistência, verificando-se uma resistência entre 75-90% à meticilina, enquanto que no *S. aureus* esta ronda os 40-60%. Para além da meticilina, *S. epidermidis* demonstra resistência a outros antibióticos, incluindo rifamicina, fluoroquinolonas, gentamicina, tetraciclina, cloranfenicol, eritromicina, clindamicina e sulfonamidas. A vancomicina é uma das poucas opções terapêuticas disponíveis (Kleinschmidt *et al.*, 2015; Otto, 2009).

Uma das espécies comensais de fungos basidiomicetes existentes na microbiota da pele humana é a *Malassezia* spp. A colonização da pele por *Malassezia* spp. começa imediatamente após o nascimento e aumenta até ao primeiro ano de idade. A colonização mantém-se relativamente baixa até à puberdade, altura na qual as glândulas sebáceas são mais ativas e promovem um habitat melhor às populações, aumentando a sua colonização. Estudos metagenómicos sugerem que a colonização por *Malassezia* depende da idade, sendo visto como um efeito protetor, pois previne a colonização por espécies patogénicas, especificamente dermatófitos. Fatores intrínsecos do hospedeiro, tais como a variabilidade genética, condições ambientais, estilo de vida, práticas de higiene e sistema imunológico podem causar mudanças nas comunidades microbianas da pele desencadeando o desenvolvimento de patologias. Várias espécies de *Malassezia* podem, desta forma, ser a causa de várias doenças como pitíriase versicolor, foliculite dermatite seborreica (caspa), dermatite atópica e psoríase. Por outro lado, o uso de cateteres para nutrição parental pode promover a entrada de *Malassezia* na corrente sanguínea provocando infeções em pacientes imunocomprometidos ou bebés prematuros (White *et al.*, 2014; Grice *et al.*, 2017).

1.5 Potencial biotecnológico da macroalga *Plocamium cartilagineum*

No filo *Rhodophyta*, Kuetzing descreveu, em 1843, a família *Plocamiaceae*. Dentro desta família, o género *Plocamium* contém cerca de 40 espécies diferentes onde se pode destacar a espécie *Plocamium cartilagineum*.

Plocamium cartilagineum (Linnaeus) P.S.Dixon, 1967 (Filó: *Rhodophyta*; Subfiló: *Eurhodophytina*; Classe: *Florideophyceae*; Subclasse: *Rhodymeniophycidae*; Ordem: *Plocamiales*; Família: *Plocamiaceae*; Género: *Plocamium*) caracteriza-se por ser uma alga de tom escarlate brilhante, com talos compridos, estreitos e cartilagineos, que cresce até 30 cm de comprimento. Apresenta diversas ramificações, tufadas e muito divididas. A ramificação caracteriza-se por ser irregularmente alternada, ramos curtos de um lado são opostos a ramos mais longos do outro lado. Cada um destes ramos possui dois a três ramos mais curtos e curvos, em série, que se assemelham a um pente. O seu nome em latim significa flexível, mas firme e resistente. Esta espécie encontra-se amplamente distribuída nos diversos oceanos e mares em todo o mundo, incluindo as águas frias do Ártico e Antártico, águas temperadas da Europa, Ásia, África e Américas, e as águas tropicais do Pacífico, Atlântico e Índico. É encontrada em costas de forte a moderada ondulação e em profundidades entre os 2-26 m. A sua existência em abundância promove a sua deslocação para a costa em grandes quantidades (Young *et al.*, 2013; Saunders *et al.*, 2005; Cremades *et al.*, 2011; Dixon, 1967).

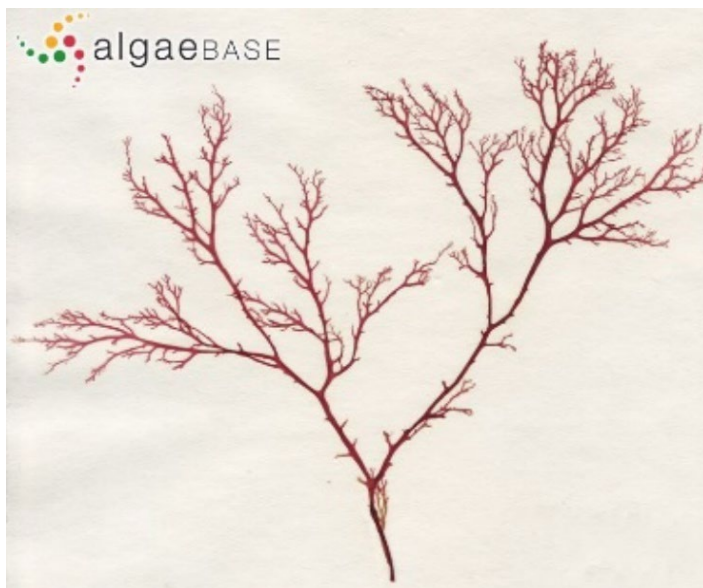


Figura 1.3 *Plocamium cartilagineum*. Autor: Christine Wosnitza. Fonte: <http://algaebae.org>. Acedido a 13 de dezembro de 2020.

Vários estudos de caracterização química identificaram a presença de diversas moléculas em *P. cartilagineum*, entre os quais monoterpenos halogenados e ácidos gordos polihalogenados. Atualmente, sabe-se que *P. cartilagineum* possui um elevado potencial inseticida, acaricida, antioxidante e anticancerígeno, perspetivando-se que o seu potencial bioativo pode alastrar-se a outras atividades (Rovirosa *et al.*, 1988; Díaz-Marrero *et al.*, 2002; Rezanka *et al.*, 2001; Inés *et al.*, 2004; San-Martin *et al.*, 1991; San-Martin *et al.*, 1986; Mynderse *et al.*, 1978; Valentão *et al.*, 2010).

OBJETIVOS

Em 2014, a OMS reportou o estado atual da magnitude da resistência a antimicrobianos, assim como da vigilância global. A resistência a antimicrobianos dentro de uma ampla gama de agentes infecciosos é uma situação crescente em saúde pública e uma grave ameaça a todos os países: surge uma época pós-antibióticos. Esta situação deixa de ser uma fantasia apocalíptica e passa a ser uma real ameaça à saúde pública no século XXI. O aumento contínuo de bactérias resistentes nos últimos anos, causado principalmente por um uso excessivo e inadequado de agentes antimicrobianos, tem conduzido a uma ineficaz terapêutica no combate de infeções: infeções comuns e ferimentos ligeiros podem levar à morte. Como tal, tornou-se extremamente importante a descoberta e desenvolvimento de novos fármacos com atividade antimicrobiana (WHO, 2014). Neste âmbito, o grupo de investigação liderado pelo Professor Doutor Rui Pedrosa estudou 27 macroalgas da costa de Peniche, identificando quatro espécies como possíveis fontes de novos compostos com atividade antimicrobiana, sendo uma das espécies a alga vermelha *Plocamium cartilagineum*.

2.1 Objetivo Geral

Partindo de algumas das espécies reportadas pela OMS (WHO, 2014), este trabalho tem como objetivo principal avaliar a atividade antimicrobiana da alga *Plocamium cartilagineum* contra os microrganismos patogénicos humanos: *Staphylococcus aureus*, *Salmonella enteritidis*, *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Klebsiella pneumoniae* e *Candida albicans*.

Dada a importância do equilíbrio da microbiota da pele na saúde humana, foi também avaliado a atividade antimicrobiana de *P. cartilagineum* contra microrganismos patogénicos humanos da área da dermatologia (pele e cabelo) com vista ao desenvolvimento de novos produtos farmacêuticos que poderão possuir diversas funções.

Por fim, e tendo em conta a crescente relevância da exploração sustentável dos recursos naturais, nomeadamente dos recursos marinhos, no presente trabalho, *P. cartilagineum* foi também avaliada quanto ao seu potencial de produzir compostos com propriedades antimicrobianas contra microrganismos patogénicos de peixes, possibilitando novas soluções para aplicação em aquaculturas.

Esta abordagem integrativa permite retirar o máximo partido da alga *P. cartilagineum* como fonte de compostos antimicrobianos com possível aplicação em várias indústrias-chave da economia Portuguesa.

2.2 Objetivos Específicos

1. Extração de compostos bioativos com recurso a solventes orgânicos de diferentes polaridades.
2. Avaliação da capacidade antimicrobiana em:
 - a. Bactérias, gram-positivas e gram-negativas, patogénicas humanas e patogénicas de peixes;
 - b. Fungos patogénicos humanos.
3. Avaliação da atividade inibitória da formação de biofilmes microbianos.
4. Estudo dos mecanismos de ação associados aos danos na membrana/parede celular e DNA.
5. Avaliação da atividade hemolítica dos extratos/frações.
6. Avaliação da atividade citotóxica dos extratos/frações mais ativos na linha celular 3T3.
7. Caracterização química dos extratos/ frações com maior potencial antimicrobiano

MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 Recolha e preparação da alga *Plocamium cartilagineum*

3.1.1 Local de amostragem

Foram recolhidas amostras da alga *Plocamium cartilagineum* na praia do Porto de Areia Sul (39°21'11.574'N 9°23'19.193'W), em setembro de 2019. O local de amostragem localiza-se na Marginal Sul da península de Peniche e caracteriza-se por um pequeno areal de ondulação moderada, que possui a Este uma formação rochosa dominante quer dentro quer fora de água.



Figura 3.1 Porto de Areia Sul, Peniche, Portugal. Autor desconhecido. Fonte: <http://playocean.net>. Acedido a 13 de dezembro de 2020.

3.1.2 Acondicionamento e transporte das amostras

Os espécimes da alga foram recolhidos e colocadas em arcas isotérmicas, de forma a manter a temperatura durante o transporte até ao laboratório.

3.1.3 Triagem, identificação e conservação das amostras

No laboratório foi feita a triagem e identificação da alga *Plocamium cartilagineum* com a colaboração da Doutora Susete Pintéus, bióloga marinha com vasta experiência na identificação de algas marinhas, do MARE- Politécnico de Leiria. As algas foram lavadas com água salgada para eliminação de detritos, areias e organismos invertebrados. De seguida, foram novamente lavadas com água destilada (tipo III). A alga foi então pesada (EW 1500-2M, Kern), embalada, etiquetada e congelada a -80 °C (HERAfreeze™HFU-T Series, Thermo Fisher Scientific). Após congelação, a alga foi liofilizada (Scanvac Cool-Safe 55-4, Frilabo), triturada (picadora Moulinex 1.2.3) e conservada em embalagem opaca, à temperatura ambiente.

3.2 Preparação dos extratos/ frações

A preparação dos extratos/ frações foi efetuada de acordo com o método adaptado do trabalho de Mayachiew *et al.* (2008). Foram realizadas duas extrações distintas, a partir de solventes com diversos níveis de polaridade, de forma a extrair diferentes compostos a partir da biomassa algal. O procedimento de extração encontra-se esquematizado nas Figuras 3.2 e 3.3. Na primeira extração, a alga pulverizada foi colocada num balão de *Erlenmeyer* com diclorometano (Valente e Ribeiro, Portugal) e metanol (LabChem, Portugal), (50:50), em agitação constante, durante 12 h, seguindo-se uma filtração (papel de filtro qualitativo, nº 4, VWR™, Bélgica). A segunda extração foi realizada da mesma forma, no entanto, foram utilizados como solventes o etanol (AGA, Portugal) e água Milli-Q (Milli-Q® Advantage A10 Water Purification System, Merck Millipore), (70:30). Este extrato hidroalcoólico foi evaporado à secura e ressuspenso em água Milli-Q a cerca de 80 °C. Após filtração, obteve-se uma fase sólida insolúvel, retida no papel de filtro, e uma fase aquosa. Esta última foi colocada numa ampola de decantação e, após arrefecimento, procedeu-se a uma partição líquido-líquido (L/L), primeiro com éter

dietílico e, de seguida, com acetato de etilo (VWR Chemicals BDH[®], Bélgica). Os solventes usados foram de elevado grau de pureza.

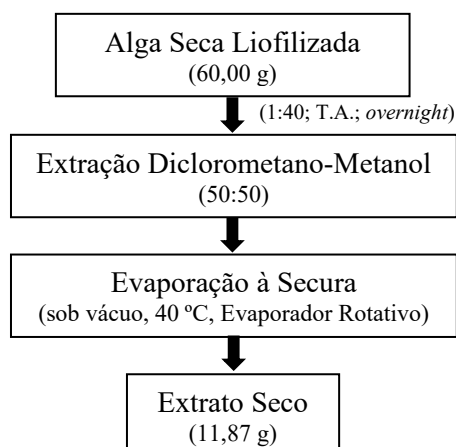


Figura 3.2 Procedimento de extração da alga *Plocamium cartilagineum* com os solventes diclorometano e metanol (50:50).

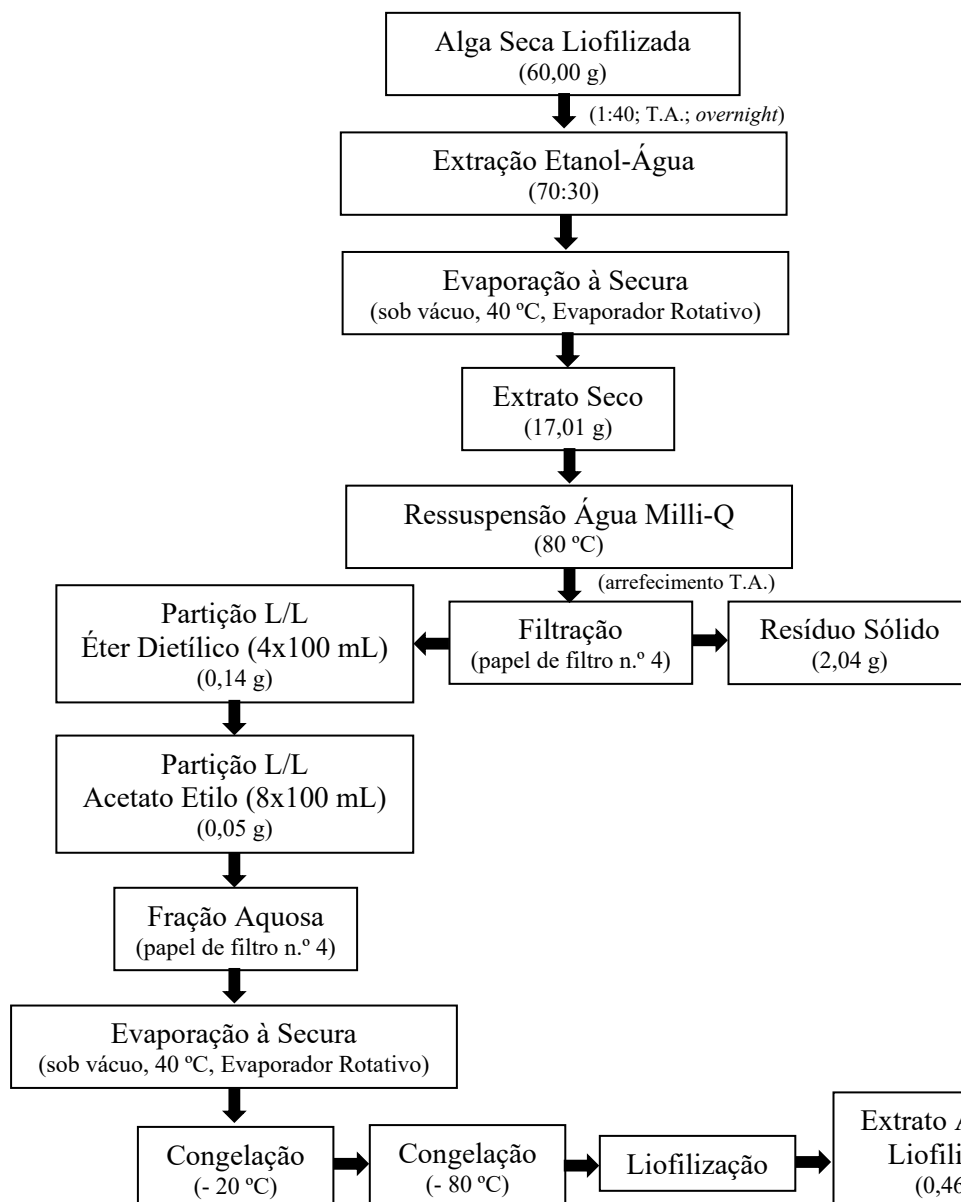


Figura 3.3 Procedimento de extração sequencial da alga *Plocamium cartilagenium* com os solventes etanol e água (70:30), água Milli-Q, éter dietílico, acetato de etilo.

Os vários extratos/ frações obtidos após filtração foram concentrados à secura com recurso a um evaporador rotativo (IKA® HB10, VWR™), obtendo-se no final diferentes frações/extratos secos. Estes foram dissolvidos em dimetilsulfóxido (DMSO) (VWR Chemicals BDH®, França), a uma concentração de 100 mg.mL⁻¹, e conservados a -20 °C para posterior utilização. O rendimento de cada uma das amostras obtidas, bem como a respetiva abreviatura usada ao longo do presente trabalho, encontram-se discriminados na Tabela 3.1.

Tabela 3.1 Extratos/ frações a partir da alga *Plocamium cartilagineum*, respetivas designações e rendimentos.

Extração	Partição L/L	Extrato/Fração	Rendimento (%)
diclorometano-metanol	n.a.	DM	19,78
etanol-água	fração sólida apolar	EA	12,20
	fração éter dietílico	ED	0,84
	fração acetato de etilo	AE	0,30
	fração aquosa	AQ	2,75

n.a - não aplicável.

3.3 Culturas microbianas

Na realização dos ensaios foram utilizadas 13 estirpes microbianas as quais podem ser divididas em dois grupos: microrganismos patogénicos humanos e microrganismos patogénicos de peixes. Dentro do grupo de microrganismos patogénicos humanos existe um subgrupo de três estirpes microbianas que causam infeção de cariz dermatológico, enquanto as restantes causam infeções generalizadas.

O grupo de microrganismos patogénicos humanos foi composto por três estirpes bacterianas gram-positivas: *Cutibacterium acnes* (DSM 1897), *Staphylococcus aureus* (DSM 1104) e *Staphylococcus epidermidis* (DSM 1798); quatro estirpes bacterianas gram-negativas: *Escherichia coli* (DSM 25922), *Klebsiella pneumoniae* (DSM 16358), *Pseudomonas aeruginosa* (DSM 27853) e *Salmonella enteritidis* (DSM 17420); e por dois fungos *Candida albicans* (DSM 1386) e *Malassezia furfur* (DSM 6170).

O grupo de microrganismos patogénicos de peixes foi composto por quatro estirpes bacterianas gram-negativas: *Aeromonas aquoriorum* (DSM 17689), *Aeromonas hydrophila* (DSM 30187), *Edwardsiella tarda* (DSM 30052) e *Vibrio anguillarum* (DSM 21597).

Todas as estirpes foram adquiridas ao biobanco DSMZ – *German Collection of Microorganisms and Cell Cultures*.

3.4 Meios de cultura

Os meios de cultura utilizados para crescimento das culturas microbianas acima descritas foram *Lysogeny Broth* (LB) (VWR™ Chemicals, Bélgica), *Trypticase Soy Broth* (TSB) (VWR™ Chemicals, Bélgica), *Brain Heart Infusion* (BHI) (VWR™ Chemicals, Bélgica), *Yeast extract*, *Peptone*, *Dextrose* (YPD) (VWR™ Chemicals, Bélgica), *Lemming-Notman* modificado (LNm) (VWR™ Chemicals, Bélgica) e TSB suplementado com cloreto de sódio (NaCl) (Merck, EUA) a 1,5% (m/v). Os meios foram preparados segundo as indicações do fornecedor e esterilizados em autoclave (Vapour line, VW®TM) a 121 °C durante 15 min.

3.5 Conservação das culturas microbianas

As culturas microbianas *stock* encontravam-se conservadas em glicerol (86-88% m/m, Scharlab S. L., Espanha) a uma concentração final de 10% (v/v) e criopreservadas a -80 °C (HERAfreeze™ HFU-T Series, Thermo Fisher Scientific).

3.6 Revitalização das culturas microbianas

As condições de revitalização das culturas encontram-se descritas na Tabela 3.2. Para gerar uma atmosfera de anaerobiose foi utilizado o sistema Anaerocult C Mini (Merck, Alemanha). Num balão de *Erlenmeyer* foram inoculados 10 µL de inóculo em 20 mL de meio de cultura, a partir das culturas *stock*.

Em simultâneo com a revitalização de cada espécie em meio líquido, foram inoculados os respetivos meios sólidos de forma a fazer uma avaliação presuntiva da cultura.

Tabela 3.2 Condições de crescimento das espécies em estudo.

Espécie	Meio	Temperatura (°C)	Agitação (rpm)	Atmosfera	Tempo
<i>C. albicans</i>	YPD	25	150	aerobiose	<i>overnight</i>
<i>E. coli</i>	LB	37	150	aerobiose	<i>overnight</i>
<i>K. pneumoniae</i>	TSB	37	150	aerobiose	<i>overnight</i>
<i>P. aeruginosa</i>	LB	37	150	aerobiose	<i>overnight</i>
<i>S. aureus</i>	LB	37	150	aerobiose	<i>overnight</i>
<i>S. enteritidis</i>	LB	37	150	aerobiose	<i>overnight</i>
<i>A. aquoriorum</i>	TSB	28	150	aerobiose	<i>overnight</i>
<i>A. hydrophila</i>	TSB	30	150	aerobiose	<i>overnight</i>
<i>E. tarda</i>	TSB	30	150	aerobiose	<i>overnight</i>
<i>V. anguillarum</i>	TSB + 1,5% NaCl	28	150	aerobiose	<i>overnight</i>
<i>C. acnes</i>	TSB	37	150	anaerobiose	2-3 dias
<i>M. furfur</i>	LNM	30	150	aerobiose	2-3 dias
<i>S. epidermidis</i>	BHI	37	150	aerobiose	<i>overnight</i>

rpm – rotações por minuto

Após o tempo de incubação necessário para a revitalização das culturas, transferiu-se para tubos de ensaio com meio salino a 0,9% (m/v) de NaCl (Merck, EUA), a quantidade de cultura necessária para atingir 0,5 na escala de McFarland [equivalente a $1,5 \times 10^8$ unidades formadoras de colónias (ufc).mL⁻¹] (Treyaprasert *et al.*, 2007). A quantificação da turbidez do inóculo foi efetuada com recurso a um densitómetro (DEN-1, Grant Bio). De seguida, procedeu-se à execução dos ensaios de avaliação da atividade antimicrobiana e da formação de biofilme, ambos em condições de assepsia.

3.7 Avaliação da atividade antimicrobiana

A atividade antimicrobiana dos extratos/ frações da alga *P. cartilagineum* foi testada nas espécies *A. aquoriorum*, *A. hydrophila*, *C. acnes*, *C. albicans*, *E. tarda*, *E. coli*, *K. pneumoniae*, *M. furfur*, *P. aeruginosa*, *S. enteritidis*, *S. aureus*, *S. epidermidis* e *V. anguillarum*. As culturas microbianas foram revitalizadas e padronizadas nas condições anteriormente descritas no tópico 3.6.

Para a avaliação da atividade antimicrobiana recorreu-se ao método de microdiluição em placa de 96 poços adaptado do trabalho de Veiga *et al.* (2019) quer na presença quer na ausência de extrato

da alga. Em cada poço foram testados 193 µL de meio, 5 µL de inóculo e 2 µL de extrato ou DMSO (situação controlo). Foi também despistada a possibilidade de contaminação dos extratos/ frações adicionando 2 µL de extrato a 198 µL de meio (controlo negativo). Os meios utilizados, temperatura e atmosfera de incubação foram as anteriormente mencionadas na Tabela 3.2. Todos os extratos/ frações foram testados a uma concentração final de 1 mg.mL⁻¹. Para os extratos/ frações com elevada atividade antimicrobiana (> 50% redução do crescimento) foram realizados ensaios de dose-resposta (600-3 µg.mL⁻¹). Como controlo positivo foi utilizada a oxitetraciclina (Cayman Chemical Company, EUA) (0,01– 100 µg.mL⁻¹), para as bactérias, e a anfotericina B (Sigma Life Science, Alemanha) (0.001– 10 µg.mL⁻¹), para os fungos.

As leituras foram realizadas após 6 h de incubação para *A. aquoriorum*, *A. hydrophila*, *C. albicans*, *E. coli*, *E. tarda*, *K. pneumoniae*, *P. aeruginosa*, *S. aureus*, *S. epidermidis*, *S. enteritidis* e *V. anguillarum*; após 72 h para *C. acnes*; e após 96 h para *M. furfur*. Os tempos de leitura relacionam-se com a fase exponencial da curva de crescimento. Os resultados foram obtidos espectrofotometricamente a um comprimento de onda de 600 nm (Guo *et al.*, 2008).

A atividade antimicrobiana foi calculada através do crescimento microbiano (% controlo).

$$\text{Crescimento microbiano (\% controlo)} = \frac{Abs_{t1} - Abs_{t0}}{\bar{X}Abs_{ct}} \times 100 \quad [3.1]$$

Em que:

Abs_{t0} - absorvância do crescimento do microrganismo na presença do extrato da alga, antes de incubação (t=0);

Abs_{t1} – absorvância do crescimento da bactéria na presença do extrato da alga, após o tempo de incubação (t=6, t=72 ou t=96);

Abs_{ct} – absorvância do crescimento da bactéria no meio de cultura, na presença de DMSO (situação controlo).

3.8 Avaliação da atividade inibitória da formação de biofilme

Neste ensaio, como produtoras de biofilmes foram testadas as espécies *P. aeruginosa*, *E. coli* e *E. tarda*. As culturas bacterianas foram revitalizadas e padronizadas nas condições anteriormente descritas no tópico 3.6. Para a avaliação da atividade inibitória da formação do biofilme recorreu-se ao método de O'Toole (2011) adaptado. Em placas de 96 poços foram realizadas diluições seriadas: no primeiro poço foram colocados 186 µL de meio, 10 µL de inóculo e 4 µL de extrato. Nos restantes poços foram colocados 95 µL de meio e 5 µL de inóculo. Através de *up and down*, foram transferidos 100 µL do primeiro poço para o segundo e assim sucessivamente, até ao último. No final, descartaram-se 100 µL do último poço. Foram realizadas diluições até 1/64. Para a situação controlo usou-se 5 µL de inóculo em 93 µL de meio e 2 µL de DMSO.

Todos os extratos/ frações da alga foram testados a uma concentração final de 2 mg.mL⁻¹, no primeiro poço. Os meios de cultura utilizados foram os previamente descritos na Tabela 3.2. As placas foram incubadas durante 24 h à temperatura e atmosfera descritas na Tabela 3.2. Após incubação, o meio foi aspirado. Cada poço foi lavado com 120 µL de solução salina a 0,9% (m/v) de NaCl. Foram adicionados 120 µL de violeta de cristal a 0,1% (v/v) (QCA, Espanha) e incubou-se durante 20 min à temperatura ambiente. Após o tempo de incubação, o violeta de cristal foi removido e o excesso foi lavado com água corrente. Por fim, foram adicionados 130 µL de ácido acético a 30% (v/v) (100%, VWR Chemicals BDH®, França) e foi feita a leitura. Os resultados foram obtidos espectrofotometricamente a um comprimento de onda de 550 nm.

A formação de biofilme foi calculada através da fórmula abaixo indicada.

$$\text{Formação de biofilme (\% controlo)} = \left[\frac{Abs_{teste}}{\bar{X}Abs_{ct}} \right] \times 100 \quad [3.2]$$

Em que:

Abs_{teste} - absorvância da situação teste (com os extratos/ frações da alga);

Abs_{ct} – absorvância da situação controlo.

3.9 Avaliação dos danos de DNA

Para avaliar os danos de DNA recorreu-se ao método de trabalho adaptado de Hu *et al.* (2017). Todo o protocolo foi realizado em condições de assepsia. Foi utilizado o DNA plasmídeo pGADT7 (7987 pares de base) numa concentração final de 50 ng.µL⁻¹ cedido pelo grupo de Biologia Molecular do MARE- Politécnico de Leiria. Em microtubos foram colocados 10 µL de DNA e 10 µL de extrato. Os extratos/ frações foram testados em duas concentrações finais diferentes: 5 e 0,5 mg.mL⁻¹. Como controlos negativos foram utilizados: água Milli-Q e DMSO. Como controlo positivo foi utilizado dicloreto de 2,2'-azobis (2-amidinopropano) (AAPH) (Aldrich Chemistry, Alemanha) em duas concentrações finais distintas: 50 mM e 25 mM. Os microtubos foram incubados durante 1 h a 37 °C.

3.9.1 Preparação do gel de agarose

Num balão de *Erlenmeyer* foram colocados 0,5 g de agarose (ThermoFisher Scientific, EUA) e 50 mL de tampão Tris-Acetato-EDTA (TAE) 1x (ThermoFisher Scientific, EUA). A solução foi aquecida no micro-ondas (Intellwave, LG) de forma a dissolver a agarose. Após arrefecimento, foram adicionados 5 µL de corante SYBR[®] DNA Gel Stain (ThermoFisher Scientific, EUA). A solução foi vertida para o equipamento de Eletroforese (TVG-SYS, Scie-Plas) e aguardou-se a sua solidificação.

3.9.2 Eletroforese em gel de agarose

Após a incubação do ADN plasmídeo com os extratos/ frações e respetivos controlos, foram adicionados em cada microtubo 3 µL de Loading Buffer (ThermoFisher Scientific, EUA). Em cada poço do gel de agarose foram pipetados 10 µL de cada uma das amostras e dos controlos. Paralelamente, foi efetuado um controlo com os extratos/ frações sem DNA. Ao gel de agarose foram adicionados também 5 µL Gene Ruler 1Kb DNA Ladder (ThermoFisher Scientific, EUA). A corrida ocorreu a 80 V durante 45 min. Foram realizados 3 ensaios independentes. As imagens do gel de agarose após a corrida foram visualizadas no Gel DOC E2 Imager (Biorad).

3.10 Avaliação dos danos de membrana / parede celular

Neste ensaio foram testadas as espécies *S. aureus*, *S. epidermidis*, *C. acnes*, *E. tarda* e *V. anguillarum* por terem apresentado maior suscetibilidade aos extratos/ frações. As culturas bacterianas foram revitalizadas nas condições anteriormente descritas no tópico 3.6. Para a avaliação dos danos de membrana realizaram-se duas situações experimentais, de acordo com Ojeda-Sana *et al.* (2013) (situação A) e de acordo com Yaraksa *et al.*, 2014 (situação B), ambas em condições de assepsia.

As culturas microbianas em fase exponencial de crescimento foram centrifugadas a 4000 rpm durante 5 min, o meio de cultura foi descartado e o *pellet* foi lavado duas vezes com solução salina a 0,9% (m/v) de NaCl e ressuspenso em novo meio de cultura (Situação A) ou solução salina a 0,9% (m/v) de NaCl (situação B), ajustando a turbidez a 0,5 na escala de McFarland, descontando a turbidez do meio (o equivalente a aproximadamente 1.5x10⁸ ufc/mL). Estas foram as suspensões bacterianas

utilizadas nos ensaios seguintes. A quantificação da turbidez do inóculo foi efetuada com recurso a um densitómetro.

Com base nas concentrações inibitórias de 50% do crescimento (IC_{50}) obtidas a partir da curva dose-resposta, os extratos/ frações foram testados nas concentrações $2 \times IC_{50}$, IC_{50} e $\frac{1}{2} IC_{50}$. Para a situação teste, foram adicionados num microtubo 10 μ L de extrato da alga na concentração de $2 \times IC_{50}$ e 990 μ L de suspensão bacteriana, previamente preparada. Para as situações IC_{50} e $\frac{1}{2} IC_{50}$, foram adicionados 2 microtubos com 500 μ L de suspensão bacteriana. Foram feitas diluições sucessivas, fazendo *up and down*, transferindo 500 μ L do primeiro microtubo para o segundo, e deste para o terceiro. No final descartaram-se 500 μ L da solução. Para os brancos, o procedimento foi idêntico, mas sem o inóculo e para o controlo negativo, em vez da amostra, colocou-se DMSO.

Todos os microtubos foram incubados a 37 °C para *S. aureus*, *S. epidermidis* e *C. acnes*; a 30 °C para *E. tarda* e 28 °C para *V. anguillarum*, durante 4 h, exceto para *C. acnes* que foi de 24 h, sem agitação. Para o controlo positivo foram colocados num microtubo 500 μ L de solução bacteriana o qual foi incubado a 100 °C (Dry Bath Heating Block, VWR®) durante 10 min.

Após a incubação, foi adicionado 1% de Sytox™ Green Nucleic Acid Strain e voltou-se a incubar durante 10 min no escuro. A fluorescência foi lida num leitor de microplacas (Synergy H1 Multi-Mode Microplate Reader, BioTek® Instruments, Winooski, USA) com comprimentos de onda de excitação/emissão de 535/595 nm.

Os danos de membrana, foram calculados através da seguinte equação:

$$\text{Dano membrana/ parede celular (\%)} = \left[\frac{(Fl_{\text{teste}} - Fl_{\text{branco}}) - Fl_{\text{ct neg}}}{Fl_{\text{ct pos}}} \right] \times 100 \quad [3.3]$$

Em que:

Fl_{teste} – fluorescência da situação de teste (com os extratos/ frações da alga);

Fl_{branco} – fluorescência do branco respetivo;

$Fl_{\text{ct neg}}$ – fluorescência da situação de controlo negativo;

$Fl_{\text{ct pos}}$ – fluorescência da situação de controlo positivo.

3.11 Avaliação da atividade hemolítica dos extratos/ frações

Para avaliar a atividade hemolítica dos extratos/ frações recorreu-se ao método de Feitosa *et al.* (2019) adaptado. O protocolo foi iniciado com a preparação de uma suspensão de eritrócitos de bovino a 10% (v/v) em solução salina a 0,9% (m/v) de NaCl. Para a situação de teste, os extratos/ frações da alga foram diluídos num microtubo em solução salina a 0,9% (m/v) de NaCl em duas proporções diferentes: na primeira situação foram colocados 5 μ L de extrato em 45 μ L de solução salina, enquanto na segunda situação foi colocado 1 μ L de extrato em 49 μ L de solução salina. Foram realizados 3 tipos de controlos diferentes. Para o controlo negativo, correspondente a 0% de hemólise, foram colocados no microtubo 50 μ L de solução salina a 0,9% (m/v) de NaCl. Para o controlo positivo, correspondente a 100% de hemólise, foram colocados 50 μ L de etanol a 70% (v/v). Por fim, para o controlo de DMSO, foram colocados num microtubo 10 μ L de DMSO em 40 μ L de solução salina a 0,9% (m/v) de NaCl. Em todos os microtubos, quer em situação de teste quer em situação de controlo, foram adicionados 50 μ L de suspensão eritrocitária, seguindo-se a incubação durante 1 h, a 37 °C e sem agitação.

Após incubação, os microtubos foram centrifugados a 3000 rpm durante 3 min, à temperatura ambiente. O sobrenadante foi pipetado para uma microplaca de 96 poços. A leitura do sobrenadante foi feita espectrofotometricamente a um comprimento de onda de 540 nm. A quantificação da hemoglobina no sobrenadante foi calculada através da equação:

$$\text{Hemólise (\%)} = \left[\frac{\text{Abs}_{\text{teste}} - \text{Abs}_{\text{ct neg}}}{\text{Abs}_{\text{ct pos}} - \text{Abs}_{\text{ct neg}}} \right] \times 100 \quad [3.4]$$

Em que:

$\text{Abs}_{\text{teste}}$ - absorvância da situação de teste (extratos/ frações da alga);

$\text{Abs}_{\text{ct neg}}$ - absorvância da situação de controlo negativo (solução salina);

$\text{Abs}_{\text{ct pos}}$ - absorvância da situação de controlo positivo (etanol).

3.12 Avaliação do potencial citotóxico dos extratos/ frações

3.12.1 Manutenção da cultura celular

A avaliação do potencial citotóxico dos diferentes extratos/ frações de algas foi testada numa linha celular de fibroblastos de rato, as células 3T3 (ACC 173), previamente adquiridas ao biobanco DSMZ – *German Collection of Microorganisms and Cell Cultures*.

As células 3T3 foram cultivadas, em frascos de 25 cm², com o meio *Dulbecco's Modified Eagle Medium* (DMEM)-F12 com L-Glutamina, 15 mM Hepes e Bicarbonato de Sódio (Bioweste, EUA) suplementado com 10% (v/v) de soro fetal bovino (FBS) (Gibco, EUA) e 1% (v/v) de antibiótico/ antimicótico (Bioweste, EUA). De forma, a manter a cultura celular, foram realizadas subculturas, com mudança de meio, de dois em dois dias, até se atingir a pré-confluência. Após este período, o levantamento das células foi realizado com recurso à tripsina 10X (BioWhittaker®Lonza, EUA), adicionando 500 µL em cada frasco. As células foram mantidas em cultura numa incubadora de CO₂ (CO₂ Unitherm) com 5% de CO₂, 95% de humidade e a uma temperatura constante de 37 °C.

As células, em estado de pré-confluência, após serem levantadas com tripsina 10X (BioWhittaker®Lonza, EUA) foram semeadas em placas de 96 poços a uma densidade de 1,5x10⁴ células/ poço. Para tal, nas placas de 96 poços foram adicionados 20 µL de suspensão celular e 180 µL de meio DMEM-F12 suplementado com 10% (v/v) de FBS e 1% (v/v) de antibiótico/antimicótico em cada poço. As placas de 96 poços foram a incubar durante cinco/seis dias até atingirem a confluência. Após este período os extratos/ frações da alga com maior potencial antimicrobiano foram incubados a diferentes concentrações, baseadas nos valores de IC₅₀ obtidos nos ensaios de antimicrobianos. Como controlo negativo foi adicionado DMSO e, como controlo positivo, 2 µL de saponina (Merck, Alemanha). As placas de 96 poços inoculadas com os extratos/ frações da alga foram a incubar durante 8 h.

3.12.2 Método de MTT

O método de MTT (brometo de 3-4,5-dimetil-tiazol-2-il-2,5-difeniltetrazólio) baseia-se na redução de sais tetrazólicos de MTT em cristais de formazano por células que têm desidrogenases metabolicamente ativas. Seguidamente, estes cristais são dissolvidos num solvente orgânico. A intensidade da coloração dos cristais dissolvidos é medida espectrofotometricamente, permitindo estabelecer uma relação com o número de células viáveis. Quanto maior for a quantidade de células viáveis maior é a quantidade de cristais de formazano formados (Bianco *et al.*, 2010; Silhavy *et al.*, 2010).

O efeito dos extratos/ frações da alga sobre as células 3T3 foi avaliado segundo o método de Yuan *et al.* (2006) adaptado. Após o período de incubação de 8 h, as microplacas de 96 poços tratadas com os extratos/ frações da alga foram colocadas em gelo e o meio foi aspirado. As células foram lavadas com 200 µL de tampão fosfato-salino (PBS) 1X (BioWhittaker®Lonza, EUA). Após lavagem, adicionaram-se 100 µL de MTT (1,2 mM) (VWR®Life Science, EUA) previamente dissolvido em PBS

1X. De seguida, as células foram incubadas a 37 °C, com 5% de CO₂ e 95% de humidade, durante 1 h e protegidas da luz. Após o período de incubação, o MTT foi aspirado e os cristais de formazano resultantes foram dissolvidos em 100 µL de DMSO. Os resultados foram obtidos espectrofotometricamente, num comprimento de onda de 570 nm. A viabilidade celular foi calculada com recurso à seguinte fórmula:

$$Viabilidade\ celular\ (\%controlado) = \left[\frac{Abs_{teste} - \bar{X}Abs_{sap}}{\bar{X}Abs_{ct}} \right] \times 100 \quad [3.5]$$

Em que:

Abs_{teste} – absorvância da situação teste (extratos/ frações);

Abs_{sap} – absorvância da situação controlo positivo (saponina);

Abs_{ct} – absorvância da situação controlo negativo (DMSO).

3.13 Perfil químico da amostra com maior potencial bioativo

A amostra com maior potencial bioativo foi analisada por ressonância magnética nuclear de próton (¹H RMN). Para esse fim, a amostra foi dissolvida em 0,5 mL de clorofórmio deuterado (CDCl₃, Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, EUA) e o espectro de ¹H RMN obtido a 300 MHz num espectrómetro Bruker Fourier 300, operando a 25 °C. Os desvios químicos (δ) foram expressos em ppm, usando como referência o sinal residual do solvente (δH= 7,26 CDCl₃).

3.14 Tratamento de dados e análise estatística

Com o objetivo de se avaliar o potencial antimicrobiano, a capacidade de inibição da formação de biofilme, os danos de membrana, bem como o potencial citotóxico dos extratos/ frações, procedeu-se à verificação da normalidade dos dados. Para tal, foi aplicado o teste de *Shapiro-Wilk*. Como os dados não apresentavam uma distribuição normal, realizou-se o teste não-paramétrico *Kruskal-Wallis*. Para verificar a existência de diferenças estatísticas com o controlo ou entre situações teste foi aplicado o teste de *Mann-Whitney*. Os resultados foram apresentados sob a forma de média ± SEM e correspondem a pelos menos três experiências independentes (n=3) realizadas em triplicado. Em todos os resultados obtidos, as diferenças foram consideradas estatisticamente significativas ao nível de significância 0,05 (*p* – value <0,05). Todos os cálculos foram realizados a partir do *software GraphPad Prism v8.0.2*. A determinação do IC₅₀ foi calculada a partir da análise da regressão não-linear mediante o *software GraphPad Prism v8.0.2* com a equação $Y=100 / (1 + 10^{((\text{LogIC}_{50}-X) \times \text{HillSlope}))})$.

RESULTADOS

4.1 Atividade antimicrobiana de extratos/ frações de *Plocamium cartilagineum*

4.1.1 Atividade antimicrobiana em microrganismos patogénicos humanos

O aumento emergente de espécies microbianas resistentes a antimicrobianos é considerado pela OMS como um dos principais problemas de saúde pública a enfrentar no século XXI (WHO, 2014). Como tal, é extremamente importante a descoberta de novas moléculas que possam ser utilizadas ou que sirvam de modelo para o desenvolvimento de novos agentes terapêuticos com capacidade antimicrobiana. Deste modo, de forma a cumprir os objetivos do presente trabalho e utilizando o método de microdiluição em microplacas de 96 poços que nos permite desenvolver o estudo antimicrobiano com consumo reduzido de extrato da alga, foi analisada a capacidade antimicrobiana das diversas amostras provenientes da alga *P. cartilagineum* (apresentadas na Tabela 3.1) contra o fungo *C. albicans*; contra as bactérias gram-positivas *S. enteritidis* e *S. aureus*; e contra as bactérias gram-negativas *E. coli*, *K. pneumoniae* e *P. aeruginosa*. Todos os microrganismos foram testados à concentração máxima de 1 mg.mL⁻¹, sendo os resultados apresentados nas Figuras 4.1, 4.2 e 4.3.

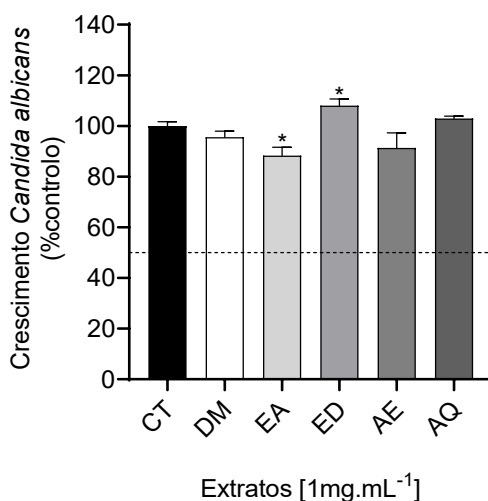


Figura 4.1 Efeito do extrato DM e das frações EA, ED, AE e AQ (1mg.mL⁻¹) da alga *Plocamium cartilagineum*, no crescimento do fungo *Candida albicans*. Os valores correspondem à média ± erro padrão da média de 3 experiências independentes. O símbolo * representa diferenças significativas ($p < 0,05$) quando comparados com: * controlo.

A análise da Figura 4.1 permite verificar que, para o fungo *Candida albicans*, a fração EA da alga *Plocamium cartilagineum* potenciou uma inibição do crescimento do fungo em cerca de 10%, aproximadamente. Nos restantes extratos/ frações, a inibição do crescimento é quase inexistente, existindo, pelo contrário, promoção do crescimento na fração ED.

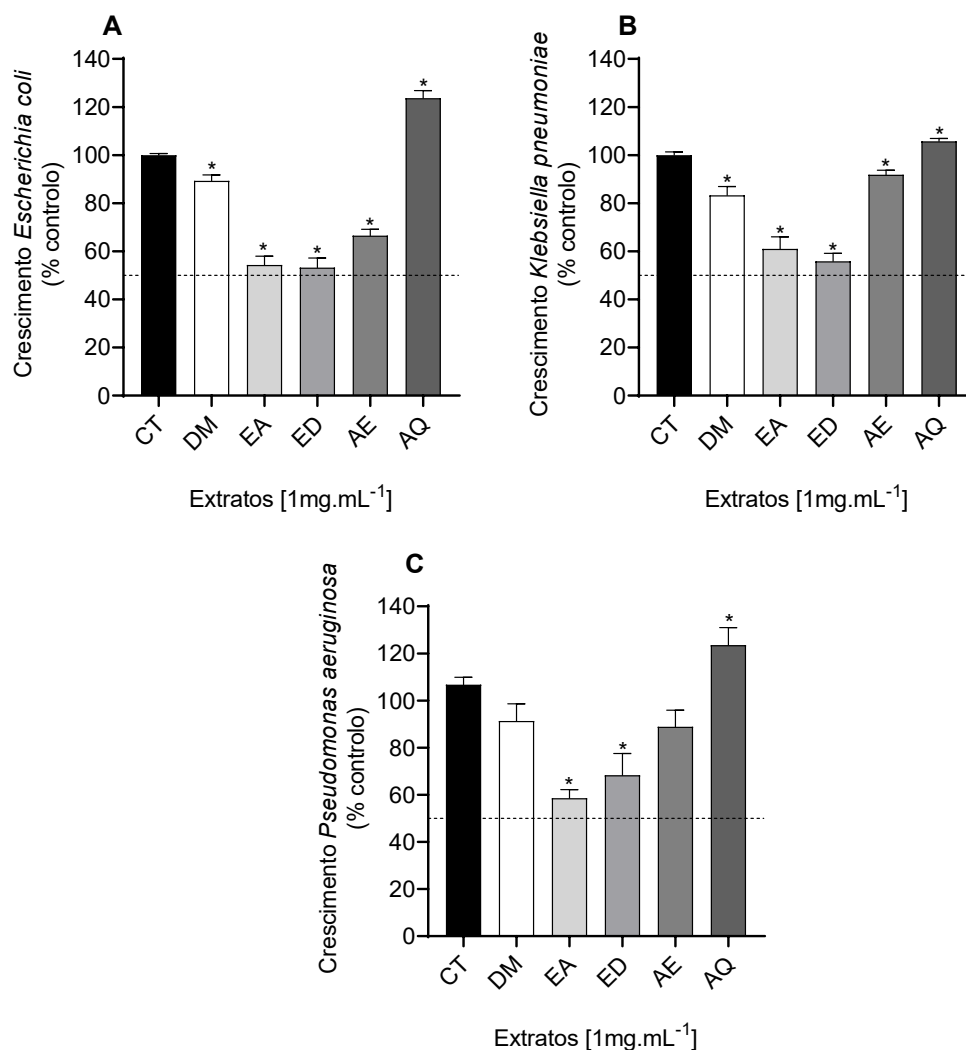


Figura 4.2 Efeito do extrato DM e das frações EA, ED, AE e AQ (1mg.mL⁻¹) da alga *Plocamium cartilagineum*, no crescimento das bactérias gram-negativas (A) *Escherichia coli*, (B) *Klebsiella pneumoniae* e (C) *Pseudomonas aeruginosa*. Os valores correspondem à média \pm erro padrão da média de 3 experiências independentes. O símbolo * representa diferenças significativas ($p < 0,05$) quando comparados com: * controle.

Na Figura 4.2 é possível verificar que para *E. coli* as frações EA e ED da alga *P. cartilagineum* potenciaram a inibição do crescimento bacteriano em cerca de 45%, aproximadamente. Por outro lado, a fração AE demonstrou, aproximadamente, uma redução do crescimento bacteriano em 30%. Para *K. pneumoniae* a redução do crescimento foi, aproximadamente, de 20% para o extrato DM e de 40% e 45% para as frações EA e ED, respetivamente. As frações EA e ED potenciaram, aproximadamente, uma inibição do crescimento de *P. aeruginosa* em 40% e 45%, respetivamente.

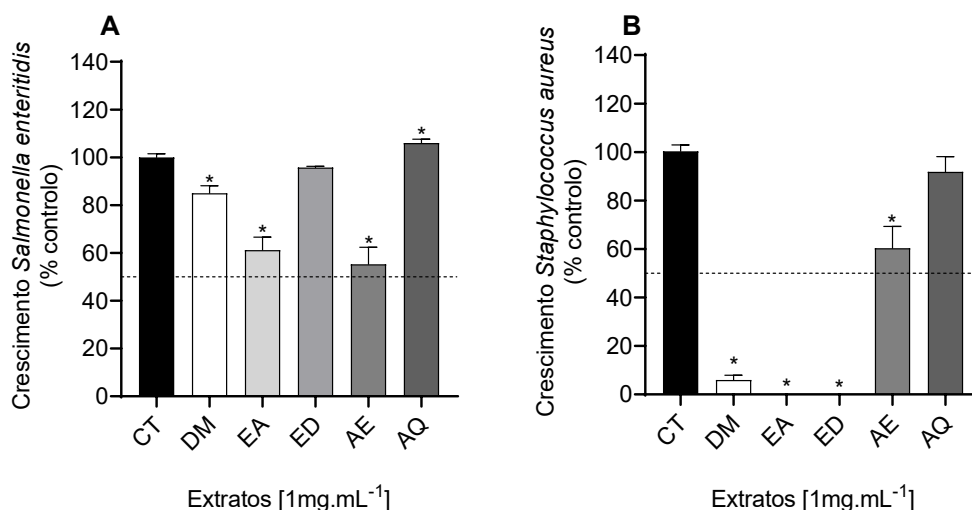


Figura 4.3 Efeito do extrato DM e das frações EA, ED, AE e AQ (1mg.mL⁻¹) da alga *Plocaminum cartilagineum*, no crescimento das bactérias gram-positivas (A) *Salmonella enteritidis* e (B) *Staphylococcus aureus*. Os valores correspondem à média \pm erro padrão da média de 3 experiências independentes. O símbolo * representa diferenças significativas ($p < 0,05$) quando comparados com: * controle.

A análise da Figura 4.3 permite verificar que o extrato DM inibiu o crescimento de *S. enteritidis* em 20%, aproximadamente, enquanto que as frações EA e AE inibiram, aproximadamente, o crescimento bacteriano em 40% e 45%, respectivamente. Para *S. aureus*, tanto o extrato DM como as frações EA e ED exibiram potencial na inibição do crescimento superior a 50%, quando testados à concentração máxima de 1 mg.mL⁻¹. Desta forma, foi realizada uma análise de dose-resposta para determinação do seu IC₅₀.

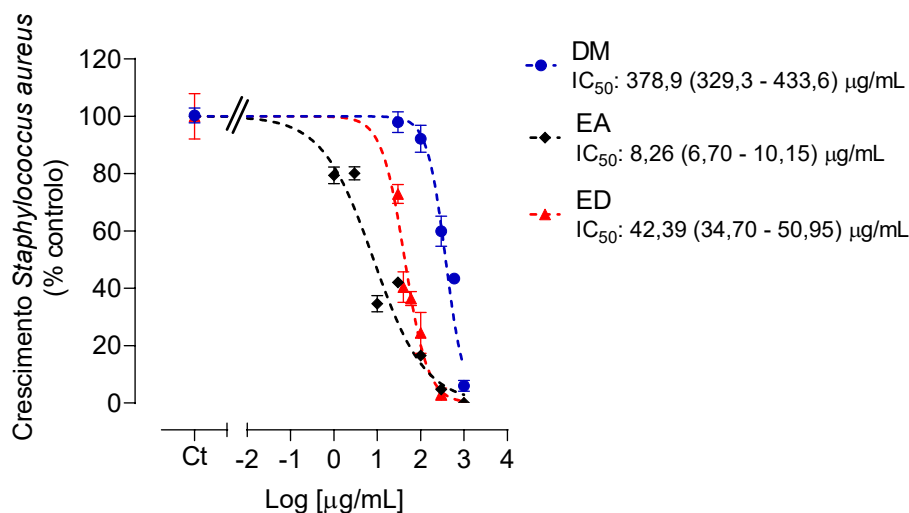


Figura 4.4 Curva dose-resposta (1000 -1 µg/mL) do extrato DM e das frações EA e ED da alga *Plocaminum cartilagineum* no crescimento de *Staphylococcus aureus*. Os símbolos representam a média de pelo menos 3 experiências independentes, as linhas verticais indicam o erro padrão da média.

Na Figura 4.4 é possível verificar que a fração EA de *P. cartilagineum* é a que demonstra ser mais potente na inibição do crescimento de *S. aureus*.

4.1.1.1 Atividade antimicrobiana em microrganismos patogênicos humanos com aplicação dermocosmética

Posteriormente à avaliação do potencial antimicrobiano dos extratos da alga contra microrganismos patogênicos, foi avaliado o seu potencial em microrganismos clinicamente relevantes em dermatologia, com vista ao desenvolvimento de novas formulações de produtos para a pele. Desta forma, os diferentes extratos/ frações da alga *Plocamium cartilagineum* foram testados contra o fungo *M. furfur* e contra duas estirpes bacterianas gram-positivas *C. acnes* e *S. epidermidis*. À semelhança do que foi avaliado anteriormente, todos os extratos foram testados a uma contração máxima de 1 mg.mL^{-1} , sendo os resultados apresentados nas Figuras 4.5 e 4.6.

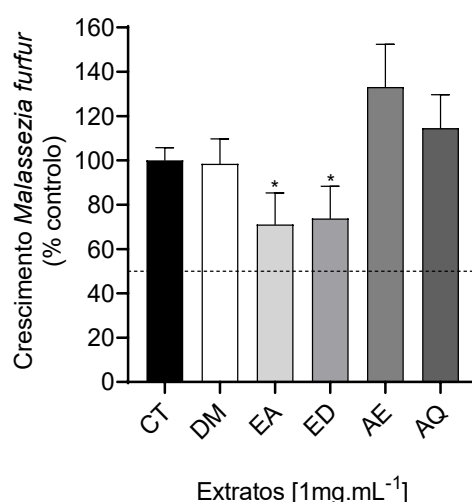


Figura 4.5 Efeito do extrato DM e das frações EA, ED, AE e AQ (1 mg.mL^{-1}) da alga *Plocamium cartilagineum*, no crescimento do fungo *Malassezia furfur*. Os valores correspondem à média \pm erro padrão da média de 3 experiências independentes. O símbolo * representa diferenças significativas ($p < 0,05$) quando comparados com: * controlo.

Na Figura 4.5 é possível verificar que ambas as frações EA e ED da alga *P. cartilagineum* inibiram o crescimento de *M. furfur* em 30%, aproximadamente.

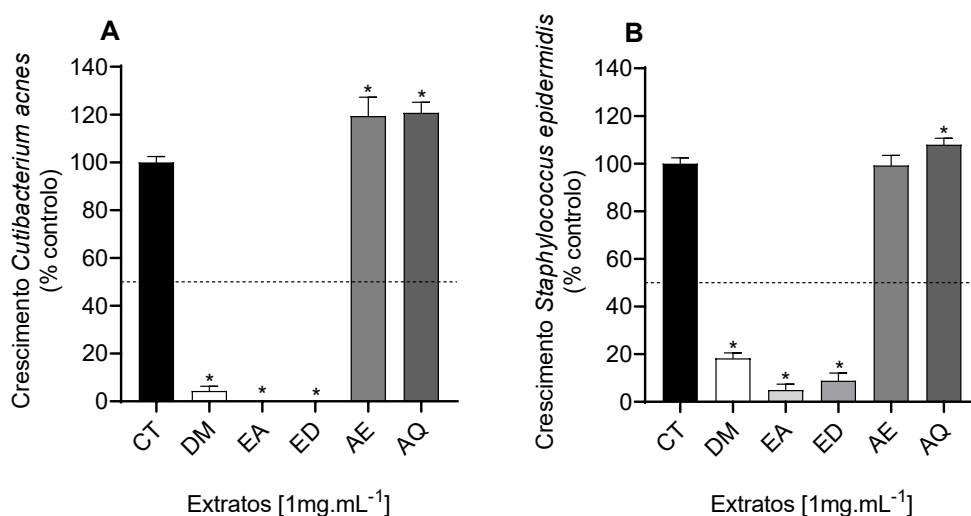


Figura 4.6 Efeito do extrato DM e das frações EA, ED, AE e AQ (1 mg.mL^{-1}) da alga *Plocamium cartilagineum*, no crescimento das bactérias gram-positivas (A) *Cutibacterium acnes* e (B) *Staphylococcus epidermidis*. Os valores correspondem à média \pm erro padrão da média de 3 experiências independentes. O símbolo * representa diferenças significativas ($p < 0,05$) quando comparados com: * controlo.

Verifica-se pela análise da Figura 4.6 que o extrato DM e as frações EA e ED exibiram potencial na inibição do crescimento tanto de *C. acnes* como de *S. epidermidis* superior a 50%, quando testados à concentração máxima de 1 mg.mL⁻¹. Desta forma, foi realizada uma análise de dose-resposta para determinação do IC₅₀, para cada uma das bactérias em questão.

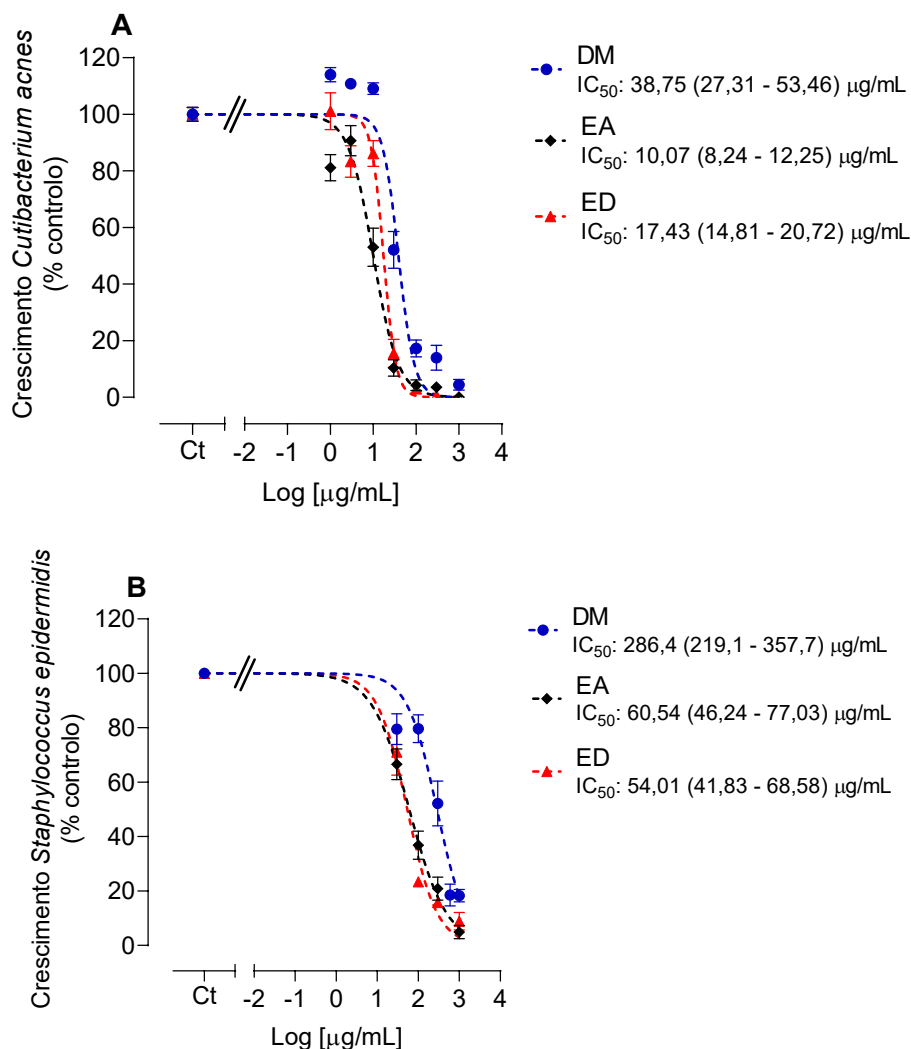


Figura 4.7 Curva dose-resposta (1000 -1 $\mu\text{g/mL}$) do extrato DM e das frações EA e ED da alga *Plocaminum cartilagineum* no crescimento de (A) *Cutibacterium acnes* e (B) *Staphylococcus epidermidis*. Os símbolos representam a média de pelo menos 3 experiências independentes, as linhas verticais indicam o erro padrão da média.

Na análise da Figura 4.7 é possível verificar que fração EA foi a que demonstrou maior potencial na inibição do crescimento de *C. acnes*. Paralelamente, para *S. epidermidis*, a fração ED foi a que demonstrou maior potencial na inibição do crescimento.

4.1.2 Atividade antimicrobiana em microrganismos patogênicos de peixes

Com o pressuposto de dar valor a um único recurso, potenciando as diversas aplicabilidades do mesmo, foi avaliada a atividade antimicrobiana da alga em estudo contra quatro bactérias gram-negativas patogênicas de peixes: *A. aquoriorum*, *A. hydrophila*, *E. tarda* e *V. anguillarum*. À semelhança do que foi avaliado anteriormente, todos os extratos foram testados a uma concentração final máxima de 1 mg.mL⁻¹, sendo os resultados apresentados nas Figura 4.8.

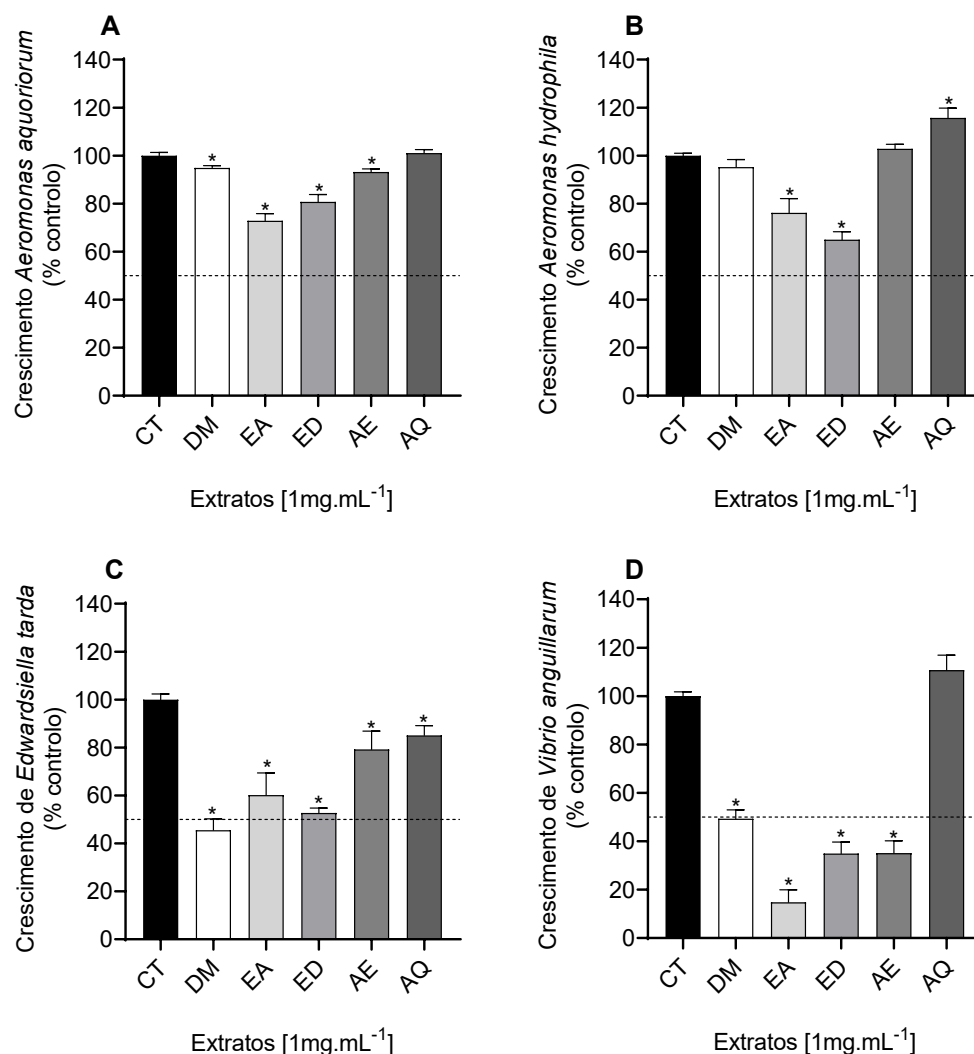


Figura 4.8 Efeito do extrato DM e das frações EA, ED, AE e AQ (1mg.mL^{-1}) da alga *Plocamium cartilagineum*, no crescimento das bactérias gram-negativas (A) *Aeromonas aquoriorum*, (B) *Aeromonas hydrophila*, (C) *Edwardsiella tarda* e (D) *Vibrio anguillarum*. Os valores correspondem à média \pm erro padrão da média de 3 experiências independentes. O símbolo * representa diferenças significativas ($p < 0,05$) quando comparados com: * controlo.

Na Figura 4.8 é possível verificar que para *A. aquoriorum*, as frações EA e ED, demonstraram inibir o crescimento em, aproximadamente, 30% e 20%, respetivamente. Estas duas frações da alga *P. cartilagineum*, EA e ED, inibiram, também, em cerca de 20% e 30%, respetivamente, o crescimento de *A. hydrophila*. Por outro lado, o extrato DM teve potencial de inibição do crescimento de *E. tarda*, superior a 50%. Da mesma forma, o crescimento de *V. anguillarum* foi inibido em mais de 50% pelo extrato DM e pelas frações EA, ED e AE, quando testados a uma concentração máxima de 1mg.mL^{-1} . Desta forma, foi realizada uma análise de dose-resposta para determinação do IC_{50} , quer para *E. tarda* quer para *V. anguillarum*.

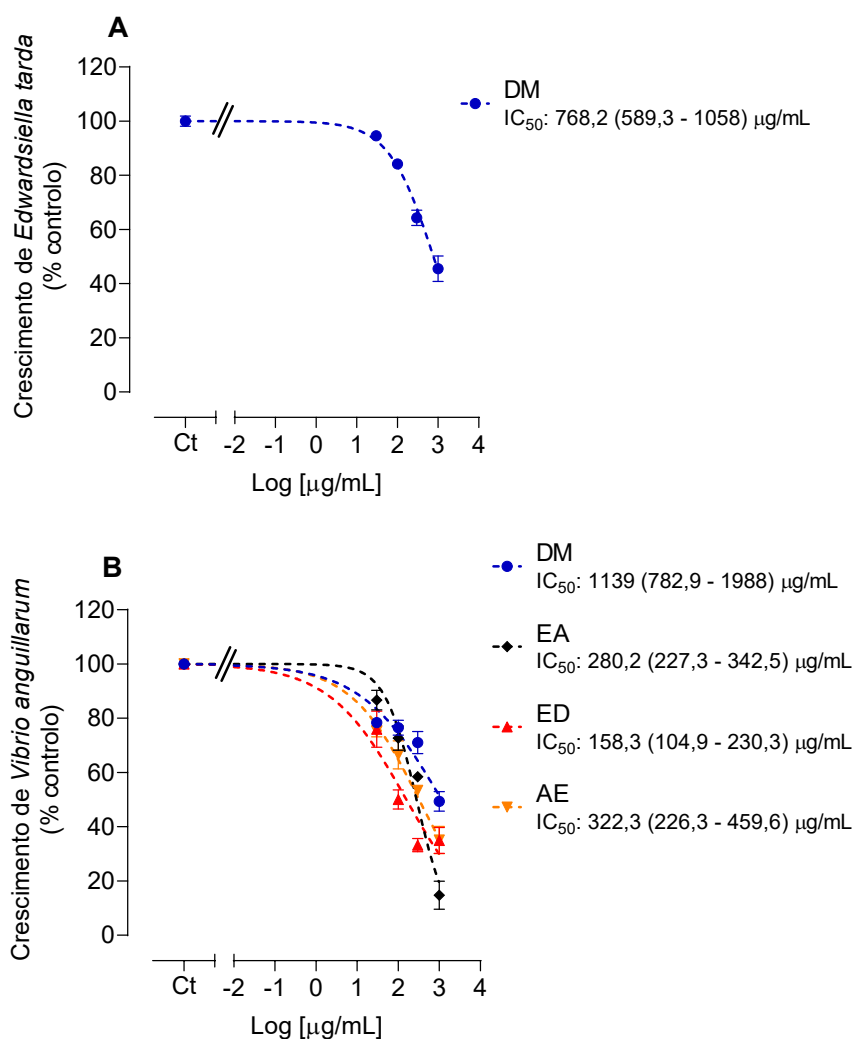


Figura 4.9 Curva dose-resposta (1000 -1 $\mu\text{g/mL}$) do extrato DM e das frações EA e ED da alga *Plocaminum cartilagineum* no crescimento de (A) *Edwardsiella tarda* e (B) *Vibrio anguillarum*. Os símbolos representam a média de pelo menos 3 experiências independentes, as linhas verticais indicam o erro padrão da média.

Na Figura 4.9 é possível verificar que, para *V. anguillarum*, a fração ED foi a que demonstrou um maior potencial na inibição do crescimento desta bactéria gram-negativa.

Na Tabela 4.1 encontram-se compilados todos os valores de IC₅₀ de todos os microrganismos em estudo, assim como do respetivo controlo positivo. Pela sua análise, verifica-se que as frações EA e ED são as mais potentes, em termos de atividade antimicrobiana.

Tabela 4.1 IC₅₀ (µg.mL⁻¹) do extrato DM e das frações EA, ED, AE e AQ da alga *Plocamium cartilagineum*, assim como dos controlos positivos, oxitetraciclina e anfotericina B, nos diferentes fungos, bactérias gram-positivas e bactérias gram-negativas estudadas. Os resultados são apresentados como média ± intervalo de confiança de, pelo menos, 3 experiências independentes.

estirpe	IC ₅₀ (µg.mL ⁻¹)						
	extratos/ frações					controlo positivo	
	DM	EA	ED	AE	AQ	oxiteciclina	anfotericina B
<i>C. albicans</i>	*	*	*	*	*	-	0,012 (0,007-0,019)
<i>E. coli</i>	*	*	*	*	*	0,001 (0,0003-0,007)	-
<i>K. pneumoniae</i>	*	*	*	*	*	0,051 (0,028-0,125)	-
<i>P. aeruginosa</i>	*	*	*	*	*	0,254 (0,196-0,324)	-
<i>S. enteritidis</i>	*	*	*	*	*	0,131 (0,086-0,206)	-
<i>S. aureus</i>	378,9 (329,3- 433,6)	8,26 (6,70- 10,15)	42,39 (34,70- 50,95)	-	-	0,148 (0,107-0,201)	-
<i>C. acnes</i>	38,75 (27,31- 53,46)	10,07 (8,24- 12,25)	17,43 (14,81- 20,72)	*	*	0,07 (0,05-0,09)	-
<i>M. furfur</i>	*	*	*	*	*	-	11,36 (8,58-14,98)
<i>S. epidermidis</i>	286,4 (219,1- 357,7)	60,54 (46,24- 77,03)	54,01 (41,83- 68,58)	*	*	13,40 (11,22-16,13)	-
<i>A. aquoriorum</i>	*	*	*	*	*	0,07 (0,06-0,08)	-
<i>A. hydrophila</i>	*	*	*	*	*	0,05 (0,04-0,06)	-
<i>E. tarda</i>	768,2 (589,3- 1058)	*	*	*	*	0,18 (0,11-0,27)	-
<i>V. anguillarum</i>	1139 (782,9- 1988)	280,2 (227,3- 342,5)	158,3 (104,9- 230,3)	322,3 (226,3- 459,6)	*	0,12 (0,06-0,28)	-

*- superior à concentração máxima testada (>1000µg.mL⁻¹)

4.2 Efeito dos extratos na inibição da formação de biofilme

4.2.1 Inibição da formação de biofilme produzido por microrganismos patogênicos humanos

Nos últimos anos foi possível verificar que as bactérias sob a forma de biofilme estariam a emergir como um novo problema de saúde pública, contribuindo para a resistência aos antimicrobianos. No contexto da patogenidade humana, a formação de biofilmes é responsável pelo agravamento e dificuldade de erradicação de infecções quer nosocomiais, associadas a biomateriais, quer infecções comuns como pneumonia, periodontite e cáries dentárias. Desta forma, é essencial a descoberta de novas moléculas com capacidade de inibição da formação de biofilme. Assim sendo, foi avaliada a capacidade do extrato DM e das frações EA, ED, AE e AQ da alga *P. cartilagineum* de inibir a formação de biofilme produzido por duas bactérias gram-negativas patogênicas humanas: *E. coli* e *P. aeruginosa*. Os resultados obtidos para *E. coli* e *P. aeruginosa* são apresentados nas Figuras 4.10 a 4.12 e nas Figuras 4.13 a 4.15, respetivamente.

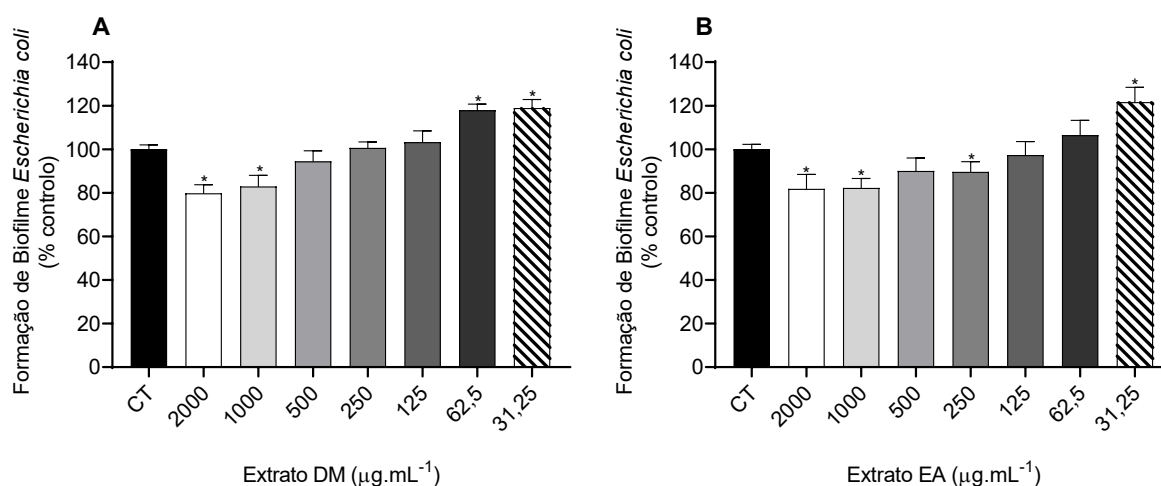


Figura 4.10 Efeito do extrato (A) DM e da fração (B) EA da alga *Plocamium cartilagineum* (2000-31,25 $\mu\text{g.mL}^{-1}$) na formação de biofilme por *Escherichia coli*. Os valores correspondem à média \pm erro padrão da média de 3 experiências independentes. O símbolo representa diferenças significativas ($p < 0,05$) quando comparados com: * controlo.

Na figura 4.10 é possível verificar que, nas concentrações de 2000 e 1000 $\mu\text{g.mL}^{-1}$, quer do extrato DM quer da fração EA, houve uma inibição de cerca de 20%, aproximadamente, na formação de biofilme por *E. coli*. Contrariamente, nas concentrações de 62,5 e 31,25 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ verifica-se um potenciamento na formação de biofilme, quer pelo extrato DM quer pela fração EA.

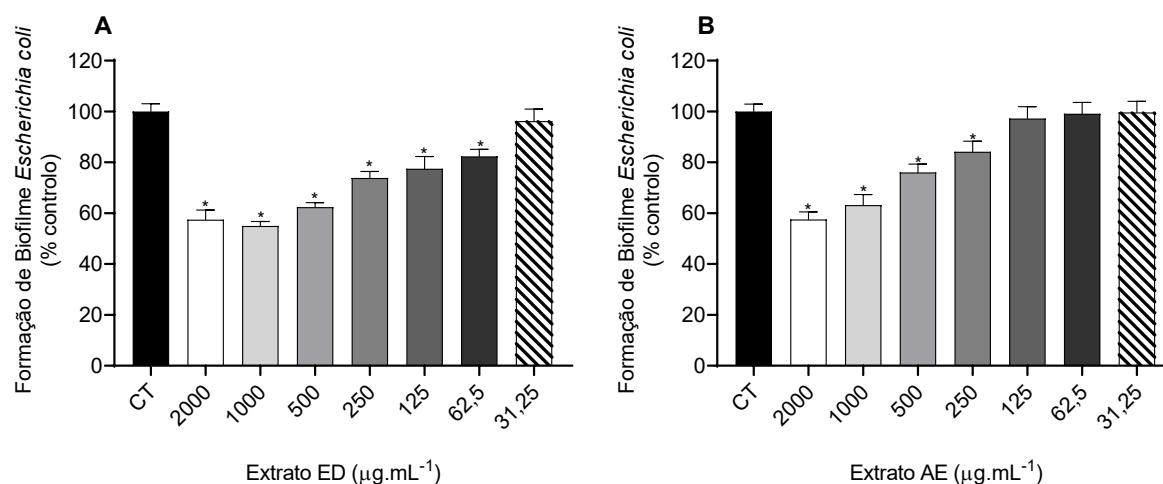


Figura 4.11 Efeito das frações (A) ED e (B) AE da alga *Plocamium cartilagineum* (2000-31,25 $\mu\text{g.mL}^{-1}$) na formação de biofilme por *Escherichia coli*. Os valores correspondem à média \pm erro padrão da média de 3 experiências independentes. O símbolo * representa diferenças significativas ($p < 0,05$) quando comparados com: * controle.

A partir da imagem 4.11 é possível verificar que, na concentração de 2000 $\mu\text{g.mL}^{-1}$, quer a fração ED quer a fração AE inibiram em mais de 40% a formação de biofilme de *E. coli*. Em ambas as frações, na concentração de 1000 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ a inibição da formação de biofilme foi, aproximadamente, de 40%. Contudo, para a fração ED, todas as concentrações testadas apresentaram inibição na formação, quando comparadas com a situação controle.

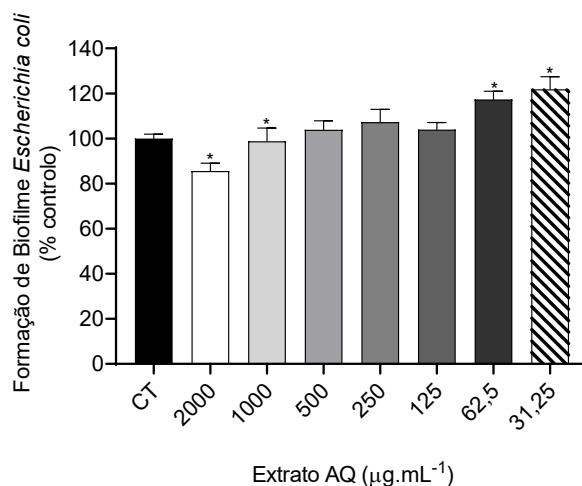


Figura 4.12 Efeito da fração AQ da alga *Plocamium cartilagineum* (2000-31,25 $\mu\text{g.mL}^{-1}$) na formação de biofilme por *Escherichia coli*. Os valores correspondem à média \pm erro padrão da média de 3 experiências independentes. O símbolo * representa diferenças significativas ($p < 0,05$) quando comparados com: * controle.

Pela análise da Figura 4.12, a fração AQ da alga em estudo, demonstrou ser a que possui menor potencial na inibição da formação de biofilme. Somente na concentração de 2000 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ houve uma inibição de cerca de 15% na formação de biofilme por *E. coli*.

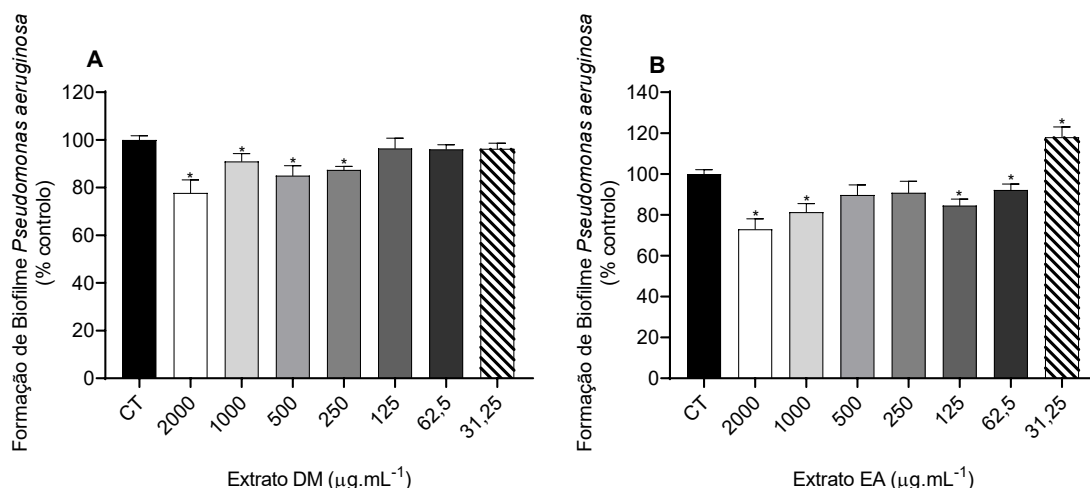


Figura 4.13 Efeito do extrato (A) DM e da fração (B) EA da alga *Plocamium cartilagineum* (2000-31,25 $\mu\text{g.mL}^{-1}$) na formação de biofilme por *Pseudomonas aeruginosa*. Os valores correspondem à média \pm erro padrão da média de 3 experiências independentes. O símbolo representa diferenças significativas ($p < 0,05$) quando comparado com: * controle.

Na Figura 4.13 é possível verificar a inibição da formação de biofilme por *P. aeruginosa*, aproximadamente em 30 %, quer pelo extrato DM quer pela fração EA, na concentração de 2000 $\mu\text{g.mL}^{-1}$. No extrato DM, entre o intervalo de concentrações de 1000-250 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ houve uma inibição da formação de biofilme entre os 10-15%. Por outro lado, a formação de biofilme foi inibida em cerca de 10-20% pela fração EA no intervalo de concentrações 1000-62,5 $\mu\text{g.mL}^{-1}$.

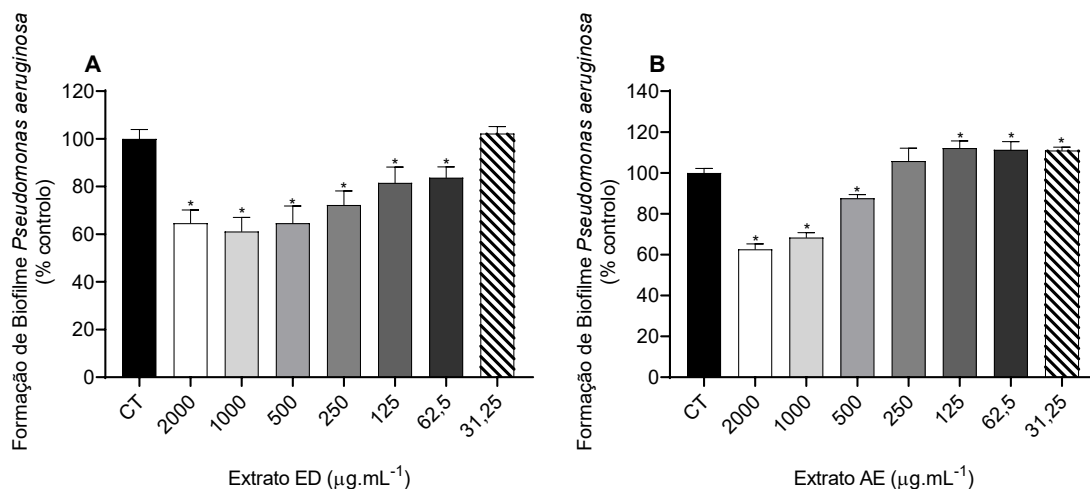


Figura 4.14 Efeito das frações (A) ED e (B) AE da alga *Plocamium cartilagineum* (2000-31,25 $\mu\text{g.mL}^{-1}$) na formação de biofilme por *Pseudomonas aeruginosa*. Os valores correspondem à média \pm erro padrão da média de 3 experiências independentes. O símbolo representa diferenças significativas ($p < 0,05$) quando comparados com: * controle.

Na Figura 4.14 é possível verificar, que nas concentrações de 2000 e 1000 $\mu\text{g.mL}^{-1}$, quer a fração ED quer a fração AE demonstraram uma redução na formação de biofilme de *P. aeruginosa*, em cerca de 40%.

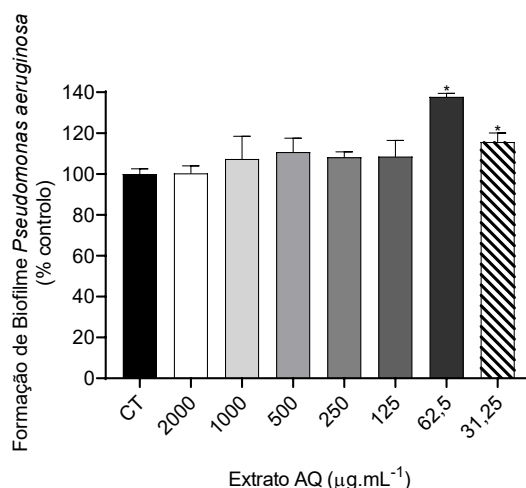


Figura 4.15 Efeito da fração AQ da alga *Plocamium cartilagineum* (2000-31,25 µg.mL⁻¹) na formação de biofilme por *Pseudomonas aeruginosa*. Os valores correspondem à média ± erro padrão da média de 3 experiências independentes. O símbolo representa diferenças significativas ($p < 0,05$) quando comparados com: * controle.

A partir da Figura 4.15 é possível verificar que a fração AQ não demonstra potencial na inibição da formação de biofilme de *P. aeruginosa*, verificando-se, pelo contrário, a promoção da formação de biofilme.

4.2.2 Inibição da formação de biofilme produzido por microrganismos patogênicos de peixes

O biofilme não possui só importância clínica quando se trata de um hospedeiro humano. Em sistemas de aquacultura tem-se verificado que a patogenicidade de peixes neste tipo de ambientes, quer seja do sistema fechado quer do sistema aberto, encontra-se intimamente associada com a formação de biofilme. Esta característica acentua a infecciosidade dos agentes patogênicos, tornando as infecções cada vez mais crônicas e resistentes a antimicrobianos. Para tal, à semelhança do que foi realizado para os microrganismos patogênicos humanos, foi estudado o efeito que o extrato DM e as frações EA, ED, AE e AQ possuem na formação de biofilme por *E. tarda*. Os resultados obtidos são apresentados nas Figuras 4.16 a 4.18.

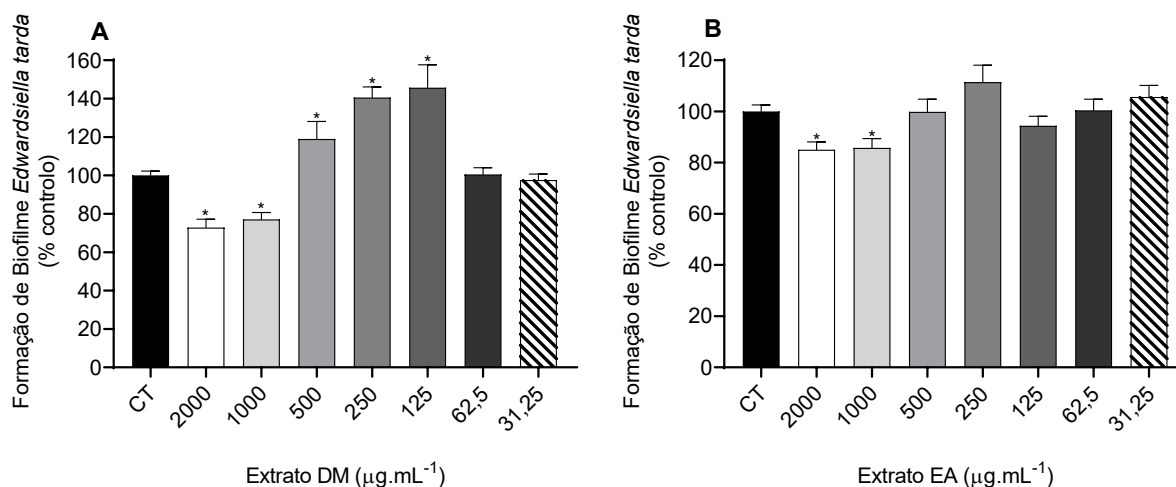


Figura 4.16 Efeito do extrato (A) DM e da fração (B) EA da alga *Plocamium cartilagineum* (2000-31,25 µg.mL⁻¹) na formação de biofilme por *Edwardsiella tarda*. Os valores correspondem à média ± erro padrão da média de 3 experiências independentes. O símbolo representa diferenças significativas ($p < 0,05$) quando comparados com: * controle.

Na Figura 4.16, o extrato DM demonstrou, nas concentrações de 2000 e 1000, uma inibição na formação de biofilme produzido por *Edwardsiella tarda*, de cerca de 40%. No intervalo de concentrações entre 500-125 $\mu\text{g.mL}^{-1}$, houve uma elevada potenciação na formação de biofilme. Por sua vez, a fração EA, nas concentrações de 2000 e 1000 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ reduziu a formação de biofilme em, aproximadamente, 15%.

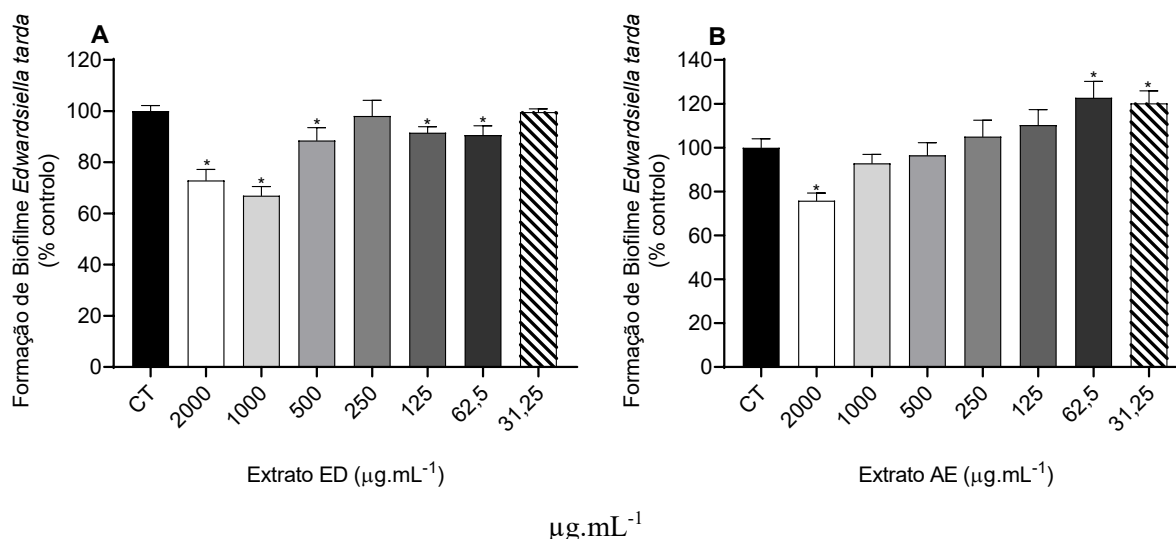


Figura 4.17 Efeito das frações (A) ED e (B) AE da alga *Plocamium cartilagineum* (2000-31,25 $\mu\text{g.mL}^{-1}$) na formação de biofilme por *Edwardsiella tarda*. Os valores correspondem à média \pm erro padrão da média de 3 experiências independentes. O símbolo representa diferenças significativas ($p < 0,05$) quando comparados com: * controle.

A Figura 4.17 demonstra que a formação de biofilme produzido por *E. tarda* foi inibido em cerca de 30-35% pela fração ED nas concentrações 2000 e 1000 $\mu\text{g.mL}^{-1}$. A fração AE promoveu uma inibição de, aproximadamente, 25% na formação de biofilme de *E. tarda* na concentração de 2000 $\mu\text{g.mL}^{-1}$.

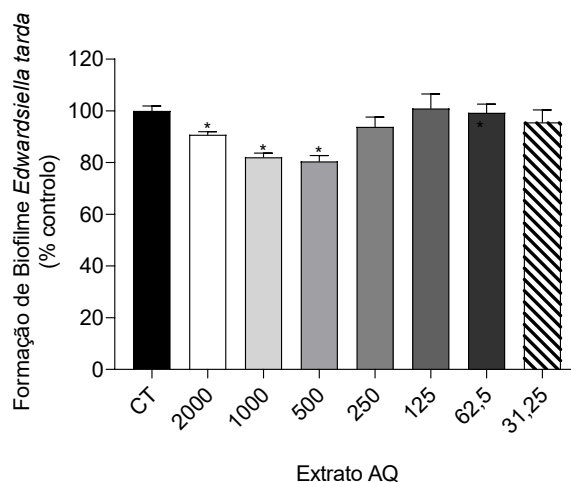


Figura 4.18 Efeito da fração AQ da alga *Plocamium cartilagineum* (2000-31,25 $\mu\text{g.mL}^{-1}$) na formação de biofilme por *Edwardsiella tarda*. Os valores correspondem à média \pm erro padrão da média de 3 experiências independentes. O símbolo representa diferenças significativas ($p < 0,05$) quando comparados com: * controle.

A Figura 4.18, demonstra que a fração AQ inibiu em cerca de 20% a formação do biofilme produzido por *E. tarda* nas concentrações de 1000 e 500 $\mu\text{g.mL}^{-1}$.

4.3 Efeitos dos extratos no DNA plasmídeo

Um dos alvos conhecidos para os antibióticos é o DNA. Como tal, verificou-se se o extrato DM e as frações EA, ED, AE e AQ, obtidos a partir da alga *Plocamium cartilagineum*, possuíam capacidade de degradação do DNA. Os resultados são apresentados na Figura 4.19.

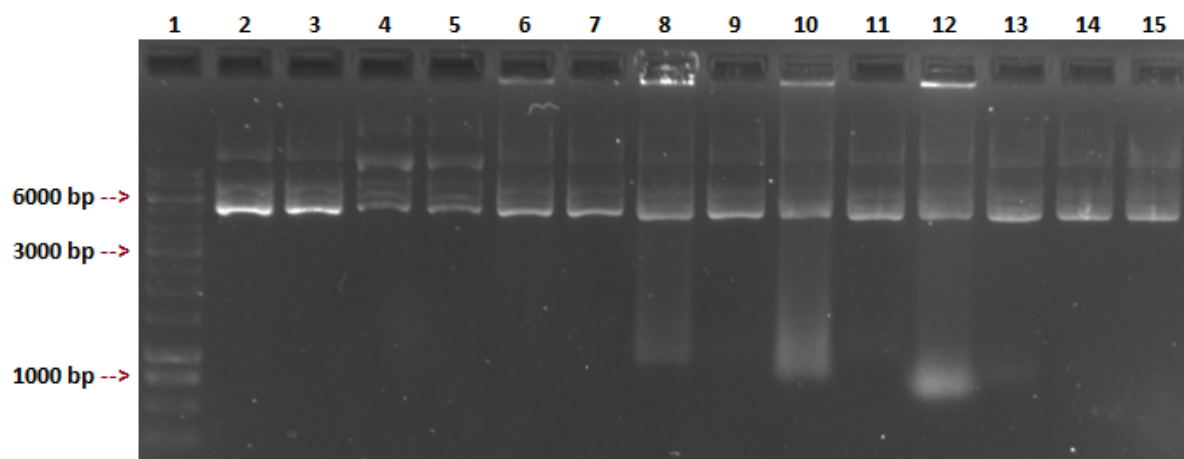


Figura 4.19 Gel de agarose. 1- Marcador; 2- Controlo negativo (H₂O); 3- Controlo negativo (DMSO); 4- Controlo positivo AAPH 100nM; 5- Controlo positivo 50nM; 6- DM 5 mg.mL⁻¹; 7- DM 0,5 mg.mL⁻¹; 8- EA 5 mg.mL⁻¹; 9- EA 0,5 mg.mL⁻¹; 10- ED 5 mg.mL⁻¹; 11-ED 0,5 mg.mL⁻¹; 12-AE 5 mg.mL⁻¹; 13- AE 0,5 mg.mL⁻¹; 14- AQ 5 mg.mL⁻¹; 15-AQ 0,5 mg.mL⁻¹. Corrida de 80V durante 45 min. Imagem obtido através de Gel DOC E2 Image. No controlo efetuado somente com os extratos não foi visível qualquer banda.

Na Figura 4.19 é possível observar as bandas do DNA incubado com água Milli-Q, com DMSO, com AAPH e com todos os extratos da alga em estudo, em duas concentrações diferentes. O DNA com a água foi utilizado como controlo negativo e permitiu verificar uma banda definida sem evidência de arrastamento de fragmentos. Não foram detetadas diferenças entre a situação com DMSO e o controlo negativo. Em ambas as bandas de AAPH, utilizado como controlo positivo, é possível verificar que esta se encontra mais fraca que as restantes, o que sugere ter ocorrido degradação de DNA. Quanto às amostras dos extratos, verifica-se que as frações EA, ED e AE, as três na concentração mais elevada (5 mg.mL⁻¹) demonstram ter capacidade de degradar o DNA, sendo visível um arrastamento de fragmentos no gel.

4.4 Efeitos dos extratos na membrana plasmática dos microrganismos

Para a análise dos danos de membrana, o protocolo foi executado em duas situações distintas: situação A e situação B. Para cada uma das bactérias estudadas em que os extratos da alga demonstraram atividade antimicrobiana, nomeadamente *S. aureus*, *C. acnes*, *S. epidermidis*, *E. tarda* e *V. anguillarum*, foram avaliados os efeitos na membrana plasmática quando incubados os extratos às concentrações de 2xIC₅₀, IC₅₀ e ½ IC₅₀.

Os resultados de ambos os protocolos são apresentados nas Figuras 4.20 a 4.24.

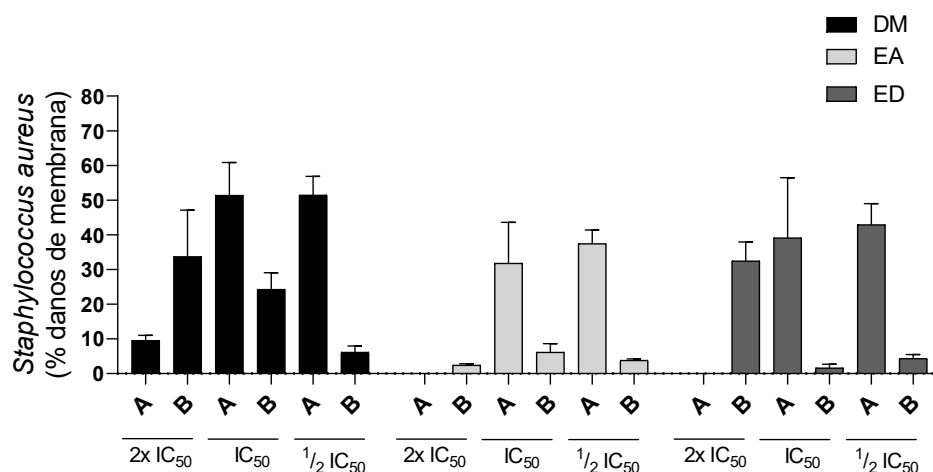


Figura 4.20 Avaliação dos danos de membrana plasmática (%), provocados pelo extrato DM e pelas frações EA e ED da alga *Plocamium cartilagineum*, em *Staphylococcus aureus*, nas situações A (incubação de 4h, 37 °C em meio de cultura LB) e B [incubação de 4h, 37 °C em solução salina a 0,9% (m/v) de NaCl], nas concentrações de 2xIC₅₀, IC₅₀ e 1/2IC₅₀. Cada coluna representa a média ± erro padrão da média de 3 experiências independentes. Sem diferenças estatísticas entre diferentes concentrações para a mesma situação nem entre situações diferentes para a mesma concentração, em cada extrato.

Podemos verificar que, para *S. aureus* (Figura 4.20), nos valores de IC₅₀ se verifica para os três extratos analisados maior percentagem de danos de membrana na situação protocolar A, embora sem diferenças estatísticas.

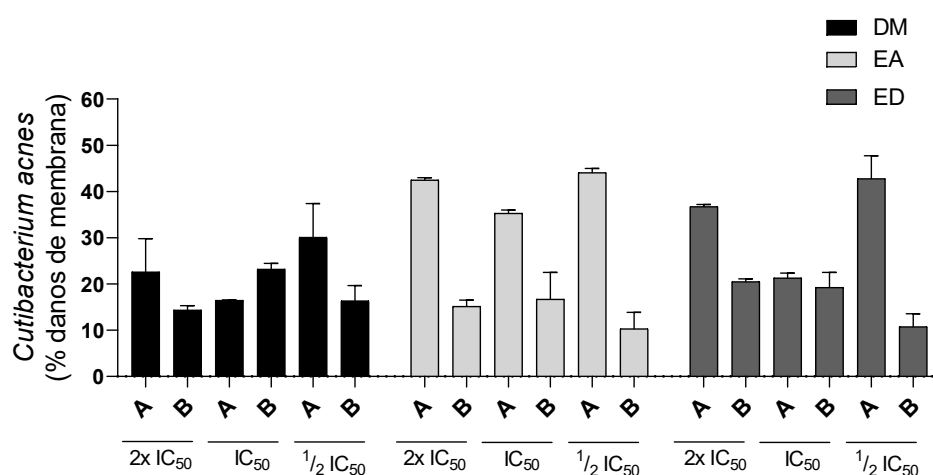


Figura 4.21 Avaliação dos danos de membrana plasmática (%), provocados pelo extrato DM e pelas frações EA e ED da alga *Plocamium cartilagineum*, em *Cutibacterium acnes*, nas situações A (incubação de 24h, 37 °C em meio de cultura TSB) e B [incubação de 24h, 37 °C em solução salina a 0,9% (m/v) de NaCl], nas concentrações de 2xIC₅₀, IC₅₀ e 1/2IC₅₀. Cada coluna representa a média ± erro padrão da média de 3 experiências independentes. Sem diferenças estatísticas entre diferentes concentrações para a mesma situação nem entre situações diferentes para a mesma concentração, em cada extrato.

Na bactéria *C. acnes* (Figura 4.21), ambos os protocolos revelam danos membranares, no entanto, na concentração de IC₅₀, com o extrato DM observam-se mais danos no protocolo B, enquanto que com as frações EA e ED existem mais danos no protocolo A, embora sem diferenças estatísticas em ambos os casos.

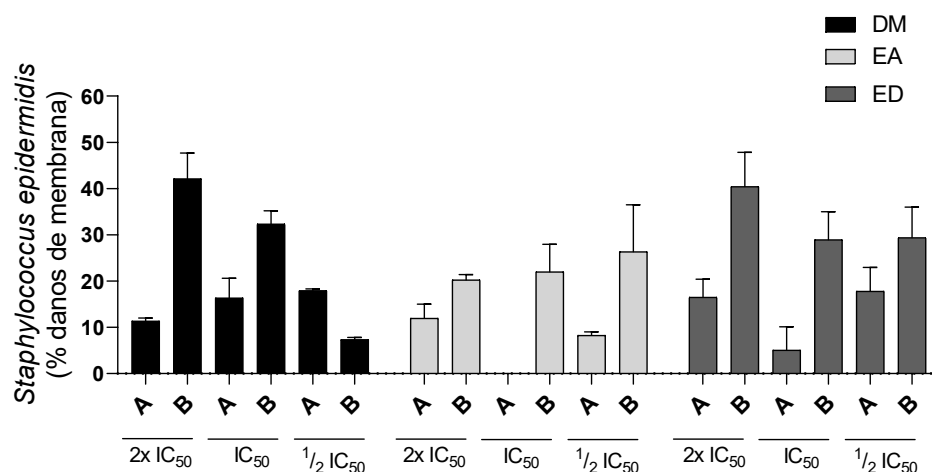


Figura 4.22 Avaliação dos danos de membrana plasmática (%) provocados pelo extrato DM e pelas frações EA e ED da alga *Plocamium cartilagineum*, em *Staphylococcus epidermidis*, nas situações A (incubação de 4h, 37 °C em meio de cultura BHI) e B [incubação de 4h, 37 °C em solução salina a 0,9% (m/v) de NaCl], nas concentrações de 2xIC₅₀, IC₅₀ e 1/2IC₅₀. Cada coluna representa a média ± erro padrão da média de 3 experiências independentes. Sem diferenças estatísticas entre diferentes concentrações para a mesma situação nem entre situações diferentes para a mesma concentração, em cada extrato.

Pela Figura 4.22, verifica-se que, contrariamente ao ocorrido na Figura 4.20, *S. epidermidis*, bactéria que pertence ao mesmo gênero de *S. aureus* (Gênero *Staphylococcus*), apresenta, para os mesmos três extratos (DM, EA e ED) na concentração IC₅₀, maior percentagem de danos de membrana na situação protocolar B, embora sem diferenças estatísticas.

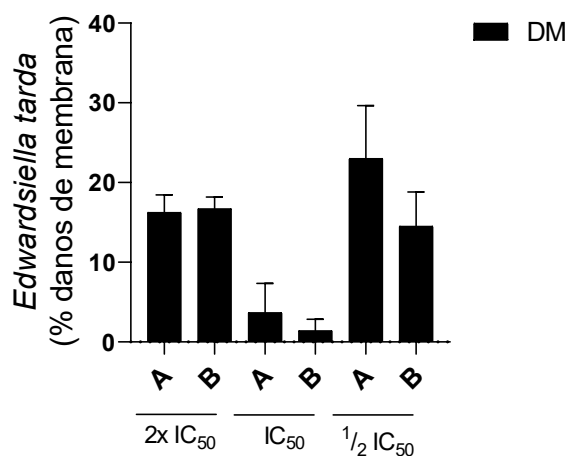


Figura 4.23 Avaliação dos danos de membrana plasmática (%), provocados pelo extrato DM da alga *Plocamium cartilagineum*, em *Edwardsiella tarda*, nas situações A (incubação de 4h, 30 °C em meio de cultura TSB) e B [incubação de 4h, 30 °C em solução salina a 0,9% (m/v) de NaCl], nas concentrações de 2xIC₅₀, IC₅₀ e 1/2IC₅₀. Cada coluna representa a média ± erro padrão da média de 3 experiências independentes. Sem diferenças estatísticas entre diferentes concentrações para a mesma situação nem entre situações diferentes para a mesma concentração, em cada extrato.

Para *E. tarda* (Figura 4.23), na concentração de IC₅₀, quer na situação A quer na situação B, verifica-se uma baixa percentagem de danos de membrana, cerca de 2,45 (0 – 4,90) % para a situação A e cerca de 1,43 (0 – 2,85) % para a situação B, resultados que aumentam, em percentagem, quando comparamos com as concentrações 2xIC₅₀ e 1/2 IC₅₀, embora sem diferenças estatísticas.

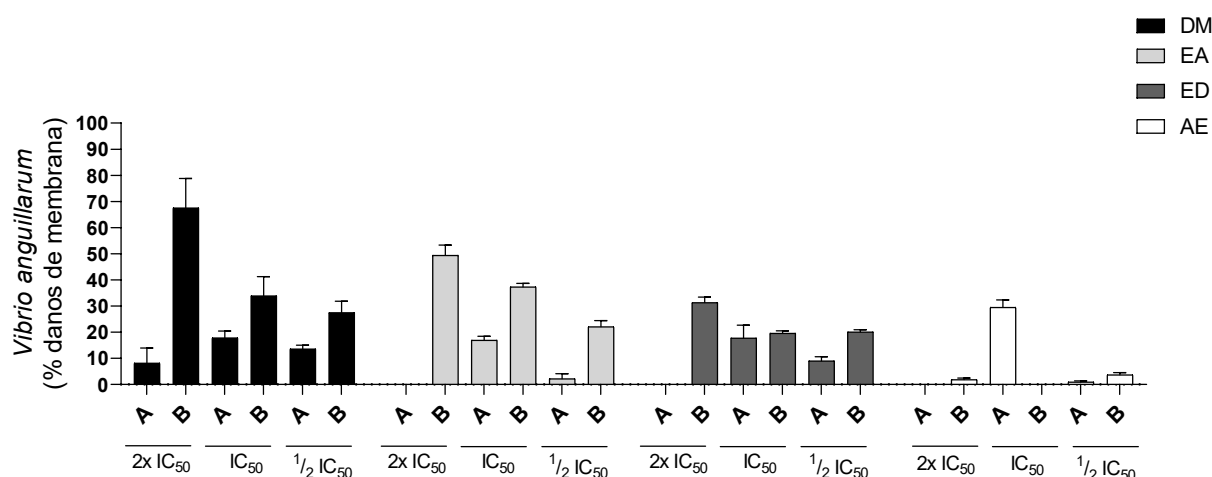


Figura 4.24 Avaliação dos danos de membrana plasmática (%), provocados pelo extrato DM e pelas frações EA, ED e AE da alga *Plocamium cartilagineum*, em *Vibrio anguillarum*, nas situações A [incubação de 4h, 28 °C em meio de cultura TSB + 1,5% (m/v) de NaCl] e B [incubação de 4h, 28 °C em solução salina a 0,9% (m/v) de NaCl], nas concentrações de 2xIC₅₀, IC₅₀ e 1/2IC₅₀. Cada coluna representa a média ± erro padrão da média de 3 experiências independentes. Sem diferenças estatísticas entre diferentes concentrações para a mesma situação nem entre situações diferentes para a mesma concentração, em cada extrato.

Para *V. anguillarum* (Figura 4.24) há a destacar que a fração AE, à exceção da concentração de IC₅₀ da situação A, quase não revela capacidade de dano de membrana. Por outro lado, no extrato DM e nas frações EA e ED, verifica-se dano de membrana, na concentração de IC₅₀, na situação B e menor dano na mesma concentração, mas na situação A. Em todas as situações não se verificaram diferenças estatísticas.

4.5 Atividade hemolítica dos extratos

Para uma boa aplicabilidade dos extratos em termos de desenvolvimento de produtos biotecnológicos é essencial verificar se estes possuem toxicidade. Neste estudo verificámos a capacidade que os extratos têm em promover a hemólise em eritrócitos de carneiro. Os resultados obtidos são apresentados na Tabela 4.2.

Tabela 4.2 Valor em percentagem de hemólise provocado pelos diferentes extratos/frações de *Plocamium cartilagineum* em eritrócitos de carneiro. Os valores são apresentados como média (intervalo de confiança) e representam quatro ensaios independentes. Não se verificaram diferenças estatísticas entre diferentes extratos ou diferentes concentrações.

Extrato/ Fração	[5mg.mL ⁻¹]	[1mg.mL ⁻¹]
DM	1,67 (-1,66 – 4,99)	3,52 (-0,25 – 7,30)
EA	-0,04 (-0,61 – 0,53)	5,51 (1,19 – 9,83)
ED	18,08 (15,21 – 20,96)	8,20 (6,24 – 10,16)
AE	7,74 (5,13 – 10,35)	6,22 (5,03 – 7,41)
AQ	-7,81 (-12,82 – -2,79)	-4,02 (-4,50 – -3,54)

Observando a Tabela 4.2 podemos verificar que a fração ED é a que apresenta maior capacidade hemolítica, quer na concentração de 5 mg.mL⁻¹ (15,21-20,96%) quer na concentração de 1 mg.mL⁻¹ (6,24-10,16%). Contrariamente, a fração AQ, em ambas as concentrações, demonstrou valores negativos.

4.6 Citotoxicidade dos extratos em fibroblastos 3T3

A citotoxicidade dos extratos/ frações foi avaliada em fibroblastos 3T3 após 8h de incubação e os resultados são apresentados na Figura 4.25.

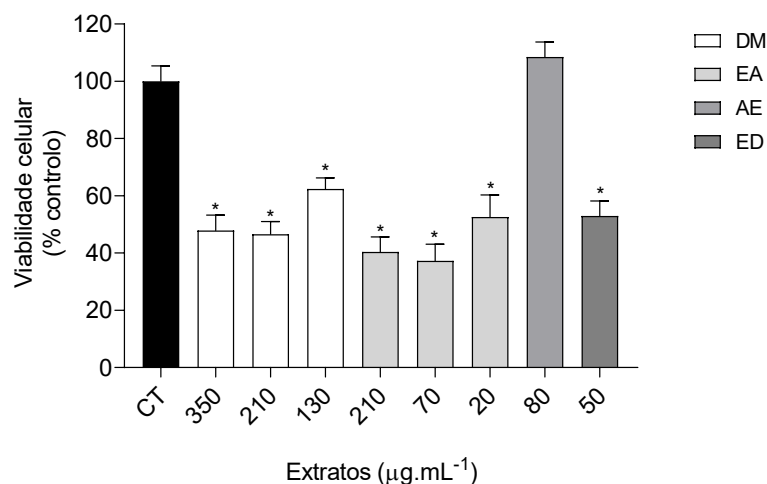


Figura 4.25 Efeito citotóxico do extrato DM, e das frações EA, AE e ED da alga *Plocamium cartilagineum*, nas concentrações (μg.mL⁻¹): 350; 210 e 130 (DM); 210; 70 e 20 (EA); 80 (AE); e 50 (ED), na viabilidade celular das células 3T3 após 8 h de incubação. Os valores correspondem à média ± erro padrão da média de 3 experiências independentes. O símbolo * representa diferenças significativas ($p < 0,05$) quando comparados com: * controle.

Todas as frações reduziram significativamente a viabilidade celular das células 3T3, exceto a fração AE que, quando testada a 80 μg.mL⁻¹, não induziu qualquer efeito citotóxico.

4.6 Caracterização química da fração EA

A fração com maior potencial bioativo foi analisada por ressonância magnética nuclear de próton (¹H RMN) e o seu espectro pode ser visualizado na figura 4.26.

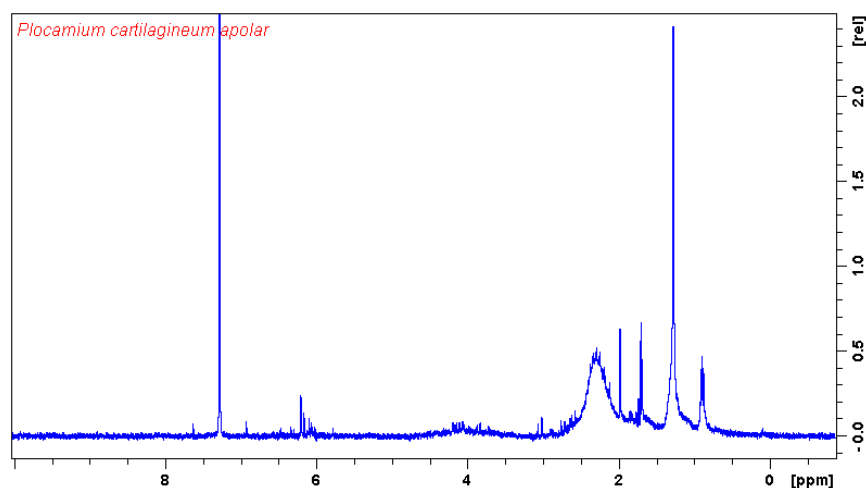


Figura 4.26 Espectro ¹H RMN (300 MHz) da fração EA de *Plocamium cartilagineum*.

No espectro de ^1H RMN (Figura 4.26) a fração com potencial bioativo mais promissor (EA) apresentou sinais na zona de 0,87-2,41 ppm característicos de compostos mais apolares como ácidos gordos, pigmentos e outros lípidos (Rodrigues *et al.*, 2019). Foram também observados sinais a 3,01-3,06 ppm e na zona 6,02-6,47 ppm que podem ser atribuídos a monoterpenos mono- e polihalogenados, contendo cloro e bromo, já identificados em espécies de *Plocamium* (Shilling *et al.*, 2019; Timmers *et al.*, 2012; Dariás *et al.*, 2002).

DISCUSSÃO E CONCLUSÃO

O ambiente marinho, caracterizado pela sua elevada e exigente competitividade, é um dos mais ricos e complexos ecossistemas. Como resposta à pressão ecológica resultante deste ambiente, as algas desenvolveram mecanismos de defesa, isto é, adaptaram-se fisiologicamente, através da produção de metabolitos secundários complexos que atuam como reguladores de funções biológicas específicas, nas quais se podem destacar os compostos com propriedades antimicrobianas (Pintéus *et al.*, 2018; Amador *et al.*, 2003; Falanga *et al.*, 2016; Pérez *et al.*, 2016). Para este estudo, a alga *Plocamium cartilagineum* foi recolhida na região interdital, isto é, na zona “entre-marés”, estando sujeitas a períodos de imersão (na preia-mar) e emersão (na baixa-mar), assim como à ação de organismos epífitas, competidores, bactérias e vírus patogénicos e herbívoros. Todos estes fatores são preponderantes na produção de novos compostos com as mais diversas atividades, tais como a antimicrobiana (Bianco *et al.*, 2010). Um outro aspeto a ter em conta na extração de compostos, é a escolha das metodologias de extração e os solventes utilizados, sendo que estes parâmetros irão influenciar a predominância de determinados grupos de compostos e consequentes bioatividades. Neste trabalho foram realizadas duas extrações independentes: uma, utilizando diclorometano-metanol (50:50, v/v), e outra, utilizando etanol-água (70:30, v/v). Após a ressuspensão deste último em água foi efetuado um fracionamento, através de uma separação líquido-líquido utilizando dois solventes, éter dietílico e acetato de etilo. Desta forma, foram obtidos os cinco extratos/frações cujo potencial antimicrobiano foi avaliado neste trabalho: extrato diclorometano/metanol (DM), fração etanol/água insolúvel (EA), fração éter dietílico (ED), fração acetato de etilo (AE), e fração aquosa (AQ). A metodologia de extração/fracionamento aqui descrita permitiu obter compostos com diferentes características de polaridade, fornecendo também, ainda que indiretamente, de grupos de compostos com maior potencial bioativo antimicrobiano.

A OMS relatou que a resistência a antimicrobianos afeta cada vez mais microrganismos comuns, levando a uma ineficácia terapêutica que contribui, quer para o aumento do número de mortes, quer para um aumento nos gastos económicos relacionados com a saúde, sendo esta uma grave ameaça de saúde pública que todos os países têm de enfrentar no século XXI. Neste âmbito, e com o intuito de descoberta de novas fontes de antimicrobianos testou-se o extrato DM e as frações EA, ED, AE e AQ do extrato de etanol-água da alga *P. cartilagineum* contra microrganismos patogénicos humanos, alguns dos quais referenciados pela OMS: *Staphylococcus aureus*, *Salmonella enteritidis*, *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Klebsiella pneumoniae* e *Candida albicans*. A avaliação da atividade antimicrobiana foi realizada através da técnica de microdiluição. Esta técnica, apesar de não ser a técnica padrão definida pelo *National Committee for Clinical Laboratory Standards*, é uma técnica recorrentemente utilizada no estudo da atividade antimicrobiana de extratos vegetais e que tem como vantagens a reprodutibilidade, o fato de ser 30 vezes mais sensível que outros métodos descritos na literatura, permitindo testar um grande número de amostras e ser economicamente mais viável (Ostrosky *et al.*, 2008).

Nos resultados obtidos verifica-se que *S. aureus* foi sensível ao extrato DM e às frações EA e ED do extrato de etanol-água, sendo a fração EA a mais potente [$IC_{50} = 8,26 (6,70-10,15) \mu g.mL^{-1}$]. Verifica-se que os nossos resultados estão de acordo com trabalhos anteriormente publicados. El Shafay *et al.* (2016) demonstraram que extratos obtidos de diferentes solventes orgânicos, como o etanol, o metanol e o éter dietílico, possuem atividade antimicrobiana, destacando o caso específico de *Ceramium rubrum*, uma alga *Rhodophyta* como *P. cartilagineum* que possui atividade contra diversos patogénicos incluindo *S. aureus*. Estes resultados são também apoiados pelos trabalhos de Kavita *et al.* (2014), que verificaram que extratos da *Rhodophyta Laurencia papilosa* possuía atividade antimicrobiana contra a mesma estirpe de *S. aureus*. O cruzamento destes dados permite-nos inferir que, neste contexto, as algas

vermelhas, onde se inclui *P. cartilagineum*, possuem capacidade antimicrobiana contra *S. aureus*, uma bactéria gram-positiva. De facto, as bactérias gram-positivas evidenciam uma maior sensibilidade a extratos de algas que as bactérias gram-negativas, permitindo-nos equacionar que esta realidade pode estar relacionada com a sua estrutura característica (Ballantine *et al.*, 1987). As bactérias gram-negativas caracterizam-se pela existência de uma estrutura membranar mais complexa e resistente composta por duas membranas (uma interna e outra externa), separadas por um espaço periplasmático onde se encontra uma fina camada de peptidoglicano, assim como diversas enzimas capazes de degradar moléculas antimicrobianas. Por sua vez, as bactérias gram-positivas possuem uma só membrana que é revestida externamente por uma grossa camada de peptidoglicano (Silhavy *et al.*, 2010; Lambert, 2002). *Staphylococcus aureus* é uma das espécies referenciadas pela OMS como uma ameaça para a saúde pública, pelas resistências que possui a diversos antibióticos. Esta espécie é causadora de diversas patologias tais como, pneumonia e endocardite, ou gastroenterite e síndrome do choque tóxico, dada a capacidade de algumas estirpes produzirem toxinas (Loir *et al.*, 2003). Os resultados obtidos revelam importância no desenvolvimento e descoberta de novas moléculas com capacidade antimicrobiana, que poderão ser utilizados como ponto de partida para o desenvolvimento de novos medicamentos/antibióticos.

Com o intuito acrescentar valor a um único recurso, contribuindo desta forma para uma exploração sustentável dos recursos existentes, decidiu-se estudar outras possíveis aplicabilidades dos extratos. Como tal, numa segunda parte do estudo dos antimicrobianos, foi avaliada a aplicabilidade de *P. cartilagineum* como fonte de compostos com potencial dermatológico. Cada vez mais, existe uma procura por produtos dermocosméticos de origem natural e que, ao mesmo tempo, possuam uma componente terapêutica para problemas de pele e de cabelo. Neste contexto, o efeito dos extratos da alga em estudo foi avaliado contra microrganismos patogénicos humanos direcionados para a área dermatológica, nomeadamente *Cutibacterium acnes*, *Staphylococcus epidermidis* e *Malassezia furfur*. Os resultados sugerem novamente que o extrato DM e as frações EA e ED do extrato de etanol-água possuem atividade antimicrobiana, neste caso, contra *C. acnes* e *S. epidermidis*. Freitas *et al.* (2020) verificaram que extratos de acetato etílico da alga *Fucus spiralis* possuem atividade contra *C. acnes* e Alghazeer *et al.* (2013) relataram que extratos metanólicos de *Cystoseira stricta* possuem atividade contra *S. epidermidis*. Como já verificado para *S. aureus*, a fração EA é uma das mais promissoras, visto ter apresentado a maior efeito inibitório contra *C. acnes*. No caso de *S. epidermidis* foi a fração ED a que revela maior potência, logo seguida da fração EA. Mais uma vez verificámos que *P. cartilagineum* à semelhança de outras algas vermelhas (*Rhodophyta*) possui uma elevada capacidade antimicrobiana contra bactérias gram-positivas. Como já mencionado, as algas, para além do potencial antimicrobiano, possuem compostos com outro tipo de bioatividades, revelando um potencial enorme deste recurso para aplicações cosméticas. Vários autores relatam as propriedades antioxidantes de extratos de diversas algas (Pintéus *et al.*, 2017; Kim *et al.*, 2018), salientando o trabalho de Valentão *et al.* que verificaram a existência de potencial antioxidante em *P. cartilagineum* (Valentão *et al.*, 2010). Os nossos resultados revelam assim um importante ponto de partida para a descoberta de compostos que podem ter dupla funcionalidade ou uma sinergia entre si que contribua para o desenvolvimento de novos produtos de aplicação tópica, como cremes para o tratamento de *acne vulgaris* ou outras patologias dermatológicas. Por outro lado, os nossos resultados poderão ser importantes para o desenvolvimento de outro tipo de produtos profiláticos eficazes no controlo de infeções nosocomiais por *S. epidermidis*, em dispositivos médicos implantados.

Na terceira e última parte do estudo da atividade antimicrobiana dos extratos da alga *P. cartilagineum*, decidiu-se verificar o seu efeito em microrganismos patogénicos de peixe. A necessidade de novos antimicrobianos para área veterinária associada a um aumento veloz da indústria da aquacultura nos últimos anos, indústria na qual tem aparecido um preocupante *hotspot* de genes de resistência antimicrobiana (Korostynska *et al.*, 2016; Samanta *et al.*, 2020; Gastalho *et al.*, 2014)

conduziu-nos ao estudo do efeito em alguns microrganismos patogénicos de peixes comumente existentes em aquacultura: *Aeromonas aquoriorum*, *Aeromonas hydrophila*, *Edwardsiella tarda* e *Vibrio anguillarum*. Todos os microrganismos patogénicos de peixes em estudo são bactérias gram-negativas. Contrariamente aos resultados obtidos para microrganismos patogénicos humanos, verificámos que alguns dos extratos da alga revelam atividade contra duas das bactérias testadas: *E. tarda* e *V. anguillarum*. Mais uma vez, os extratos com maior potencial são os já referenciados para os microrganismos patogénicos humanos. Contudo, para *E. tarda* somente o extrato DM revela ter atividade, enquanto que para *V. anguillarum* para além do extrato DM e das frações EA e ED, a fração AE revelou também ter atividade. Estes resultados dão continuidade ao que já vem a ser testado e confirmado na literatura, embora nos permita também verificar que, para além de ter efeito sobre as bactérias gram-positivas, tem também ação sobre as gram-negativas. Apesar de menos comum, devido à maior resistência que estas bactérias apresentam a extratos de algas, estes resultados vão de encontro aos trabalhos de Rizzo *et al.* (2017) que verificaram que a alga *Hypnea cornuta* (Rhodophyta) possui atividade contra diversas bactérias patogénicas de peixes, nas quais se pode destacar *V. anguillarum*. A capacidade antimicrobiana que os extratos em estudo demonstram contra bactérias gram-negativas patogénicas de peixes e não contra bactérias gram-negativas patogénicas humanas, pode ser explicada pela partilha de habitat entre estes microrganismos e a alga e respetiva pressão ecológica partilhada entre ambos. Os resultados obtidos revelam importância, na medida em que contribuem para o desenvolvimento de respostas à problemática das resistências a antimicrobianos em aquacultura, permitindo, para além de um controlo veterinário, um controlo na formação de zoonoses através da cadeia alimentar.

Nos últimos anos, vários estudos têm demonstrado a relevância dos biofilmes microbianos na patogenicidade das infeções, existindo evidências que diversas infeções crónicas são sustentadas por agregados microbianos sésseis (Batoni *et al.*, 2015; Behlau *et al.*, 2008). Desta forma, uma propriedade emergente nos biofilmes é a capacidade que estes possuem em sobreviver à exposição de compostos antimicrobianos, nos quais se incluem os antibióticos. Como tal, decidimos verificar qual o efeito dos extratos da alga em estudo nos microrganismos patogénicos humanos e de peixes em estudo.

Foi possível verificar que, principalmente, a fração AE apresenta capacidade de inibir a formação de biofilmes nos três microrganismos estudados, nomeadamente *E. coli*, *P. aeruginosa* e *E. tarda*. Por outro lado, verifica-se também que consoante a concentração, o mesmo extrato pode inibir ou potenciar a produção de biofilme (como por exemplo o extrato DM em *E. tarda*). Estes resultados vão ao encontro da publicação de Pintéus *et al.* (2020) que verificaram que diferentes concentrações de diferentes frações da alga vermelha *Asparagopsis armata* podem inibir ou promover a formação de biofilme de *P. aeruginosa*. Na literatura verificam-se várias evidências que os biofilmes podem tolerar entre 10 a 1000 vezes concentrações maiores de antimicrobianos do que células bacterianas planctónicas (Costerton *et al.*, 1999). Por outro lado, diversos estudos sugerem que em concentrações subinibitórias, os antimicrobianos podem desencadear a produção de biofilme, como um mecanismo de defesa (López *et al.*, 2010). Comparando as duas análises efetuadas neste contexto, nenhum dos extratos inibe o crescimento de *E. coli* ou *P. aeruginosa*, no entanto, as frações ED e AE inibem a formação de biofilme de *E. coli* em cerca de 40-50%, e a fração ED inibe a formação de biofilme de *P. aeruginosa* em cerca de 40%. Embora estejamos a comparar duas situações populacionais diferentes: células planctónicas vs. células sésseis, podemos verificar que os extratos/frações possuem um ou mais compostos que interferem com a formação de biofilme microbiano, quando em concentrações mais elevadas. Podemos assim inferir que as bactérias apresentam comportamentos diferentes consoante a concentração do extrato/fração a que estão sujeitas, sendo justificável a formação de biofilme em concentrações mais elevadas, como um mecanismo de defesa para o agregado populacional, havendo um “baixar da guarda” quando a concentração desce.

A literatura menciona a existência de duas estratégias no “combate” aos biofilmes: por um lado a inibição da formação do biofilme e, por outro, a eliminação do biofilme já formado. Desta forma, esta inibição correlaciona-se, por um lado, com um bloqueio do crescimento bacteriano, o qual ocorre pelo uso de compostos com atividade bactericida e bacteriostática, e por outro, pela inibição da adesão bacteriana a uma superfície (Trentin *et al.*, 2013). Wu *et al* (2011) estudaram o efeito de extratos de *ginseng* em *Pseudomonas aeruginosa* e concluíram que, apesar de não possuírem atividade antimicrobiana, revelavam potencial quer na inibição da formação do biofilme quer na eliminação do biofilme já formado. Chegaram a esta conclusão testando separadamente cada uma das situações. No caso da inibição da formação de biofilme, os autores executam o mesmo estudo realizado com os extratos de *Plocamium cartilagineum*. Neste contexto, podemos verificar que os extratos de *P. cartilagineum*, nas concentrações mencionadas, se enquadram no segmento da inibição da formação de biofilmes. Desta forma, e de acordo com as evidências relatadas na literatura, podemos inferir que a fração AE é um promissor composto para inibir a adesão bacteriana a uma superfície (neste caso abiótica, devido ao método de ensaio em microplaca de 96 poços). Na revisão de Roy *et al.* (2018) podemos verificar que agentes anti-biofilme possuem diferentes mecanismos de ação, no entanto, o estudo efetuado não nos permite evidenciar qual o mecanismo ou mecanismos envolvidos no efeito dos extratos/ frações estudadas na inibição da formação do biofilme em todas as estirpes bacterianas testadas. No entanto, para além do bloqueio do crescimento bacteriano e da inibição da adesão a uma superfície, a inibição da formação de biofilme verificada poderá ser resultado da interrupção da comunicação celular por QS, ao interferir na sinalização intracelular bacteriana (Trentin *et al.*, 2013). QS é um mecanismo de comunicação celular de resposta a compostos autoindutores, de regulação da expressão génica, através da densidade populacional. As moléculas sinalizadoras atuam na monitorização e regulação de determinados genes, revelando-se uma vantagem competitiva, importante na formação e manutenção dos biofilmes. Algumas moléculas, como enzimas, podem atuar destruindo estas moléculas sinalizadoras, interrompendo esta comunicação celular, num mecanismo designado por *Quorum Quenching* (QQ). Alguns organismos, tais como a alga *Delisea pulchra*, produzem moléculas inibidoras da sinalização intracelular, designadas por inibidores de QS (QSI) que promovem a inibição da formação de biofilme (Lazar, 2011).

Os extratos com maior potencial antimicrobiano foram analisados quanto aos possíveis mecanismos de ação, nomeadamente o potencial para promover danos na membrana celular e no DNA. Para estudar os possíveis danos de DNA, foi utilizado um DNA plasmídeo modelo, representativo do mecanismo *in vitro*, sendo comum em diversos estudos publicados (Pintéus *et al.*, 2020, Hu *et al.*, 2017). A integridade do DNA plasmídeo modelo foi garantida *a priori*, através da análise electroforética. Neste ensaio, foi realizado em conjunto com o controlo negativo de água Milli-Q, um controlo de DMSO. Este controlo permite excluir que o DMSO (solvente onde os extratos/frações estão dissolvidos) seja um agente danificador do DNA. Como observado na Figura 4.19, verifica-se que este não possui nenhum tipo de interação com o DNA. Como controlo positivo, foi utilizado o AAPH, um composto referenciado como promotor de dano de DNA (Hu *et al.*, 2017). Na análise das bandas de AAPH, em duas concentrações diferentes, é possível verificar que a banda é menos intensa, no entanto não é possível verificar a existência de nenhum borrão ou esfregaço, o que nos permite inferir que o DNA é degradado de tal forma que percorre todo o gel. Por outro lado, é possível verificar que as frações EA, ED e AE, as três na concentração mais elevada (5 mg.mL⁻¹), possuem uma banda mais fraca seguida de um borrão ou esfregaço onde é evidente a degradação do DNA e consequente formação de bandas com menores pares de bases. Os nossos resultados enquadram os extratos da alga em estudo como possuindo compostos de ação similar à de vários antibióticos comerciais existentes e descritos na literatura que têm como alvo terapêutico o DNA do microrganismo: metronizadol, um derivado de nitroimidazol, é um antibiótico comercial, com espectro limitado, que atua no tratamento de infeções relacionadas com bactérias gram-positivas e gram-negativas anaeróbias e alguns protozoários, e que tem como alvo de

ação o DNA, provocando a sua rutura (Freeman *et al.*, 1997). Os nossos resultados vão de encontro aos obtidos por Pintéus *et al.* (2020) que verificaram que diversas frações de *Asparagopsis armata*, obtidas através de diferentes solventes usados no processo de extração, possuem propriedades que danificam a integridade do DNA. Correlacionando estes resultados com os obtidos no estudo dos antimicrobianos, verificamos que duas das frações de extrato referenciadas anteriormente com o maior potencial de ação antimicrobiana, EA e ED, poderão atuar através de dano no DNA.

Neste estudo, os danos membranares foram analisados com o uso do fluoróforo *Sytox Green*. Quando existem danos na membrana citoplasmática, este marcador penetra as células e liga-se aos ácidos nucleicos emitindo fluorescência; por outro lado, quando a membrana citoplasmática se encontra íntegra não existe emissão de fluorescência. Desta forma, a intensidade de fluorescência é diretamente proporcional aos danos membranares.

Através de análise bibliográfica, verifica-se que existem diferentes abordagens para verificação de danos membranares recorrendo ao marcador de fluorescência *Sytox Green*, nomeadamente em que o composto em estudo é adicionado às células em meio de cultura e, portanto, estando estas metabolicamente ativas (situação A) (Ojeda-Sana *et al.*, 2013) e, por outro lado, outros autores adicionam o composto em estudo às células em meio salino e, portanto, as células encontram-se latentes (situação B) (Yaraksa *et al.*, 2014; Gerits *et al.*, 2016). Decidiu-se optar por analisar os dois métodos, pois os resultados poderão ser sugestivos de o mecanismo de ação antimicrobiana estar ou não dependente de um metabolismo ativo. Esta análise torna-se particularmente pertinente tendo em conta que o desenvolvimento de resistências a antimicrobianos está intimamente relacionado com a capacidade de determinados microrganismos entrarem em estado de latência, quando expostos a agentes nocivos. Este mecanismo de resistência tem sido verificado para alguns antimicrobianos comerciais que têm como alvo a membrana celular (Windels *et al.*, 2019). A tolerância antimicrobiana permite que um microrganismo sobreviva à terapêutica com antibióticos, mesmo em altas concentrações, desde que a duração do tratamento seja limitada. Friedman *et al.* (2014) verificaram que estirpes resistentes de *E. coli* conseguem tolerar elevadas concentrações de ampicilina, ao prolongar a fase de latência ou fase *lag* durante o tempo de exposição ao antibiótico, retomando a atividade metabólica após esta exposição. Estas evidências, revelam um novo desafio no contexto das doenças infecciosas, num ponto de vista clínico.

Analisando os resultados da situação A, verifica-se que, dependendo da bactéria em teste, os diversos extratos podem ou não provocar dano na membrana celular. Os resultados obtidos vão de encontro aos resultados de Pintéus *et al.* (2017) que verificaram que frações da alga *Asparagopsis armata* têm a capacidade de provocar danos na membrana celular. Contudo, neste estudo verifica-se que, na grande maioria das frações, o dano causado é dependente da concentração da fração testada, algo que nos nossos resultados não se verificou. Ao compararmos os resultados obtidos na situação A e na situação B, verifica-se que os extratos possuem também capacidade de promover danos membranares estando os microrganismos em latência. Silva *et al.* (2011) verificaram que o elevado potencial antimicrobiano que a planta *Coriandrum sativum* (vulgarmente conhecida como coentro) apresentava contra diversos microrganismos patogénicos é devida à capacidade que esta planta possui em provocar danos na membrana de microrganismos. Curiosamente, verifica-se que sempre que não ocorre um dano de membrana acentuado pela situação A, esta ocorre na situação B, e vice-versa. Estes resultados, no contexto de resistências antimicrobianas, revelam um potencial enorme deste recurso marinho. Para além de os extratos induzirem um efeito semelhante aos antibióticos comerciais que têm como alvo a membrana celular, como as penicilinas, os componentes ativos destes extratos, ao terem origem num contexto de pressão ecológica e ao estarem associados a um sistema imunológico primitivo, não se conseguindo adaptar, podem agir à semelhança dos péptidos antimicrobianos, conhecidos como uma nova geração de promissoras moléculas, que atuam muitas das vezes pela capacidade de provocar lise osmótica e disrupções na membrana (Falanga *et al.*, 2016).

Após verificarmos que os extratos de *Plocamium cartilagineum* possuem potencial, quer antimicrobiano quer de inibição da formação de biofilme, nos diversos microrganismos testados, equacionou-se qual seria o possível impacto, em termos de toxicidade para os hospedeiros, que estes extratos poderiam apresentar. Desta forma, avaliou-se a toxicidade dos mesmos em dois estudos independentes: em células sanguíneas, avaliando assim a sua capacidade de hemólise, e num modelo celular de fibroblastos (células 3T3).

A avaliação da resistência eritrocitária é amplamente realizada por vários autores, principalmente no estudo de extratos vegetais, como uma ferramenta para avaliar a toxicidade. A extrapolação deste estudo para algas é uma mais-valia no estudo e conhecimento deste recurso marinho amplamente distribuído pelos diversos oceanos e que demonstra um potencial biotecnológico enorme, nas mais diversas áreas. O ensaio hemolítico é baseado na medição da hemoglobina libertada por células eritrocitárias, quando expostas a diferentes concentrações das amostras em estudo. A hemoglobina libertada encontra-se desta forma positivamente relacionada com a percentagem de hemólise, isto é, de lise celular de glóbulos vermelhos (Roggia *et al.*, 2019; Priyadharshini *et al.*, 2012). Em contexto de descoberta de novas moléculas com potencial antimicrobiano, com o intuito de aplicabilidade em novos medicamentos, nomeadamente antibióticos, é essencial que estas moléculas não possuam outras bioatividades que possam funcionar como um efeito secundário não desejável. Neste sentido, é essencial que os extratos de *P. cartilagineum* em estudo apresentem um baixo nível de hemólise, o que foi verificado nos três extratos/frações que apresentaram resultados mais promissores no estudo de antimicrobianos: DM, EA e ED. Na fração EA verificou-se que, na concentração mais elevada (5 mg.mL⁻¹), este extrato apresenta um valor negativo, o qual pode ser interpretado como um potencial anti-hemolítico. Por outro lado, a fração ED apresentou-se como a que apresenta maior atividade hemolítica, principalmente na concentração de 5 mg.mL⁻¹. No entanto, sendo os efeitos antimicrobianos obtidos sempre com concentrações de extratos com valores inferiores a 1 mg.mL⁻¹, pode inferir-se que nestes três extratos/frações a atividade hemolítica é bastante reduzida, o que enaltece ainda mais as propriedades desta alga. Por fim, na fração AQ apresentou em ambas as concentrações testadas valores negativos, isto é, AQ revela ser uma fração com atividade anti-hemolítica. Afsar *et al.* (2016) verificaram que diferentes extratos da planta *Acacia hydasypica* possuem potencial anti-hemolítico, quando testados em eritrócitos humanos, enquanto que Karou *et al.* (2011) verificaram que extratos da árvore *Balanites aegyptiaca* possuem elevado potencial hemolítico quando testados também em eritrócitos humanos. Como já anteriormente mencionado, o biofilme revela uma importância fulcral na fisiopatologia de infeções crónicas. Desta forma, os resultados obtidos para a fração AE são extremamente importantes no desenvolvimento de medicamentos profiláticos para a formação de biofilme. Os nossos resultados assemelham-se aos encontrados na literatura. Alves *et al.* (2012), no estudo das bioatividades de compostos de *Hypnea musciformis*, uma alga vermelha como *Plocamium cartilagineum*, verificaram que estes não possuíam citotoxicidade relevante em eritrócitos. Este ensaio permite-nos, ainda que indiretamente, identificar a presença ou ausência de saponinas nos extratos. As saponinas são compostos glicosídicos do metabolismo secundário conhecidos pela habilidade de rutura da membrana de eritrócitos (Sarikahya *et al.*, 2017). Abundantemente existentes em plantas terrestres, são também encontrados em menor quantidade em organismos marinhos como as algas, nomeadamente em extratos de *Gracilaria crassa*, *Gracilaria edulis* e *Ulva reticulate* (Feroz, 2018). Devido à baixa e/ou ausente atividade hemolítica dos extratos/frações em estudo de *P. cartilagineum*, indiretamente podemos inferir que a presença de saponinas é muitíssimo escassa ou até mesmo inexistente.

O segundo estudo da toxicidade foi realizado em células 3T3, que são células de fibroblastos de rato. O estudo da toxicidade neste tipo de células é comumente encontrado na literatura, tal como no trabalho de Freitas *et al.* (2020). A toxicidade nestas células foi testada ao incubar as mesmas durante 8 h com o extrato DM e as frações EA, AE e ED. As concentrações dos extratos/frações testadas, basearam-se nos diferentes IC₅₀ determinados no estudo da atividade antimicrobiana. Contrariamente

aos resultados obtidos na avaliação da toxicidade em eritrócitos, nas células 3T3, com exceção do extrato AE, todos os restantes demonstram que diminuem a viabilidade celular, inferindo assim a sua toxicidade. Conjugando estes resultados com os anteriores, podemos verificar que os extratos/frações mais promissores (DM, EA e ED), quando nos referimos a potencial antimicrobiano, revelam uma elevada toxicidade quando testados em células 3T3. Contudo, a fração AE que emergiu positivamente como um potencial inibidor da formação de biofilmes revela-se uma fração que não induz citotoxicidade. Estes resultados vão ao encontro dos resultados de Souza *et al.* (2012) e de Freitas *et al.* (2020), nos quais diferentes extratos/frações de algas demonstraram induzir assim como não induzir citotoxicidade em células 3T3.

Relativamente à caracterização química dos extratos/frações foi analisada a fração EA, que revelou ser a mais potente na atividade antimicrobiana. Foram identificados monoterpenos mono- e polihalogenados, que poderão estar envolvidos na atividade antimicrobiana.

Em suma, podemos concluir que os resultados obtidos no presente trabalho revelam que *P. cartilagineum*, uma alga vermelha recolhida na costa portuguesa, e amplamente distribuída pelo mundo, apresenta-se como um recurso promissor para a descoberta e identificação de novas moléculas com capacidade antimicrobiana e/ou outras aplicações associadas. As amostras DM, EA e ED destacaram-se como os três extratos/frações com maior potencial antimicrobiano, revelando atividade quer em microrganismos patogénicos humanos, quer em microrganismos patogénicos de peixes. Relativamente aos primeiros, estes podem desempenhar um importante papel ou ponto de partida para a descoberta e desenvolvimento de novos antibióticos contra um dos microrganismos multiresistentes referenciados pela OMS, o *Staphylococcus aureus*, ou serem componentes-chave na formulação de novos produtos de aplicação tópica, visto exibirem atividade contra microrganismos relacionados com a área dermatológica. Quanto aos segundos, estes extratos/frações revelam-se extremamente importantes em contexto de aquacultura, visto possuírem atividade contra alguns dos microrganismos causadores de infeção na maioria das espécies comerciais. Tendo-se obtido dados tão promissores, podemos ainda associar a estes resultados o facto da fração AE de *P. cartilagineum* demonstrar capacidade de inibição da formação de biofilme. Relativamente à forma como estes extratos interagem com os microrganismos verificámos que, tanto possuem capacidade de provocar danos no DNA como de provocar danos na membrana celular, consoante o extrato/fração ou bactéria estudada. Relativamente aos danos de membrana celular, é de enaltecer o facto de se conseguir, em algumas bactérias, provocar efeitos quando estas se encontram numa fase de latência, revelando assim um potencial de aplicabilidade em situações de tolerância microbiana. Por fim, estes extratos/frações não se revelaram tóxicos, quando estudados em eritrócitos, mas com exceção da fração AE, demonstraram citotoxicidade quando testados em células 3T3. Neste contexto, é necessário ter ciente que os extratos/frações estudados são constituídos por diversas moléculas e durante este estudo não foi possível determinar se a toxicidade existente é devida ao princípio ativo do mesmo ou a moléculas excipientes. Contudo, este tipo de estudos são uma mais-valia para o conhecimento científico sobre as bioatividades que os recursos naturais possuem e que muitas das vezes é menosprezado. Numa era considerada pós-antibiótica, onde as resistências antimicrobianas revelam um importante papel, tanto na saúde como na economia dos diferentes países, e as soluções existentes são cada vez mais reduzidas ou ineficazes, a identificação de moléculas que podem servir de guia ou ponto de partida para novas formulações, são uma mais-valia para a indústria farmacêutica. Como vimos pelos resultados obtidos ao longo deste trabalho, um único recurso pode ter diversas aplicabilidades, no âmbito dos antimicrobianos: saúde humana e animal, controlo veterinário em aquacultura, formulação dermatológicas, ou de revestimentos para biomateriais.

PERSPETIVAS FUTURAS

Como perspetiva futura, e de modo a dar continuidade ao trabalho já realizado, será importante proceder ao isolamento, purificação e identificação dos compostos presentes nas frações com maior potencial antimicrobiano. Poderá acontecer que, ao testar-se a atividade biológica de um composto isolado, a atividade antimicrobiana seja ainda mais potenciada ou, pelo contrário, verificar-se que a bioatividade resultará do efeito sinérgico entre os vários compostos existentes numa dada fração. Em todo o caso, para indústria farmacêutica, será sempre mais vantajoso produzir um antibiótico por síntese ou semi-síntese do que produzir extratos a partir de um recurso natural normalmente sujeito a variações sazonais. No entanto, é importante nunca perder de vista que muitos dos medicamentos atuais foram inspirados em estruturas moleculares biossintetizadas por organismos terrestres e marinhos, em particular plantas e macroalgas.

Seria interessante também, no âmbito da atividade antimicrobiana e de inibição da formação de biofilme, alargar este estudo a outros microrganismos e verificar todo um espectro de ação deste recurso. A par disto, seria vantajoso verificar se os extratos/frações possuem capacidade de eliminar um biofilme já formado, da mesma forma que demonstram inibição da sua formação. Para além deste aspeto, determinar a concentração mínima inibitória dos extratos/frações, assim como classificar os extratos/frações como bactericidas ou bacteriostáticos, seria outro aspeto a considerar.

A nível dos alvos de ação dos extratos/frações, poder-se-ia recorrer à técnica de Citometria de Fluxo e estudar *in vivo* o dano causado em cada uma das conjugações microrganismo-extrato/ fração, com o recurso a diversas sondas de fluorescência. Por outro lado, seria interessante avaliar o possível sinergismo entre os extratos/ frações de *P. cartilagineum* e antibióticos atualmente disponíveis no mercado farmacêutico, assim como colocar os componentes bioativos dos extratos/ frações em nanopartículas de forma a potenciar o seu efeito.

O estudo de outras bioatividades de *P. cartilagineum* poderia ser outra mais-valia, nomeadamente a avaliação do potencial anticancerígeno desta alga.

Em termos de sustentabilidade, *P. cartilagineum* não é uma alga invasora e, como tal, sendo um recurso natural a sua sobre-exploração pode ser nefasta para o equilíbrio dos ecossistemas. Desta forma, uma aplicabilidade destas descobertas pela indústria farmacêutica ou outras, terá sempre de passar por uma síntese do(s) composto(s) bioativo(s) e/ou aplicação da engenharia genética à biossíntese desses compostos em bioreator, sob condições controladas.

BIBLIOGRAFIA

- Afsar, T.; Razak, S.; Khan, M.R.; Mawash, S.; Almajwal, A.; Shabir, M. & Haq, I.U. (2016). Evaluation of antioxidant, anti-hemolytic and anticancer activity of various solvent extracts of *Acacia hydasypica* R. Parker aerial parts. *BMC Complementary and Alternative Medicine*. 16(1): 258.
- Al-Enazi, N.M.; Awaad, A.S.; Alqasoumi, S.I. & Alwethairi, M.F. (2018). Biological activities of the red algae *Galaxaura rugosa* and *Liagora hawaiiiana* butters. *Saudi Pharmaceutical Journal*. 26(1): 25-32.
- Alghazeer, R.; Whida, F.; Abduelrhman, E.; Gammoudi, F. & Azwai, S. (2013). Screening of antibacterial activity in marine green, red and brown macroalgae from the western coast of Libya. *Natural Science*. 5(1): 7-14.
- AL-Haj, N.A.; Mashan, N.I.; Shamsudin, M.N.; Mohamad, H.; Vairappan, C.S. & Sekawi, Z. (2010). Antibacterial Activity of Marine Source Extracts Against Multidrug Resistance Organisms. *American Journal of Pharmacology and Toxicology*. 5(2): 95-102.
- Alves, C.; Silva, J.; Pinteus, S.; Gaspar, H.; Alpoim, M.C.; Botana, L.M. & Pedrosa, R. (2018). From Marine Origin to Therapeutics: The Antitumor Potencial of Marine Algae-Derived Compounds. *Frontiers in Pharmacology*. 9
- Alves, M.G.; Dore, C.M.; Castro, A.J.; Nascimento, M.S.; Cruz, A.K.; Soriano, E.M.; Benevides, N.M. & Leite, E.L. (2012). Antioxidant, cytotoxic and hemolytic effects of sulfated galactans from edible red alga *Hypnea musciformis*. *Journal of Applied Phycology*. 24(5): 1217-1227.
- Amador, M.L.; Jimeno, J.; Paz-Ares, L.; Cortes-Funes, H. & Hidalgo, M. (2003). Progress in the development and acquisition of anticancer agentes from marine sources. *Annals of Oncology*, 14 (11): 1607-1615.
- Araujo, M.M. & Longo, P.L. (2016). In vitro antibacterial activity of *Origanum vulgare* (oregano) essential oil against *Escherichia coli* and *Staphylococcus aureus* strains. *Arquivos do Instituto Biológico*. 83: 1-7.
- Ballantine, D.L.; Gerwick, W.H.; Velez, S.M.; Alexander, E. & Guevara, P. (1987). Antibiotic activity of lipid-soluble extracts from Caribbean marine algae. *Hydrobiologia*. 151-152(1); 463-469.
- Batoni, G.; Maisetta, G. & Esin, S. (2016). Antimicrobial peptides and their interaction with biofilms of medically relevant bacteria. *Biochimica et Biophysica Acta*. 1858(5): 1044-1060.
- Behlau, I. & Gilmore, M.S. (2008). Microbial biofilms in ophthalmology and infectious disease. *Archives of Ophthalmology*. 126(11): 1572-1581.
- Bianco, É.M.; Teixeira, V.L. & Pereira, R.C. (2010). Chemical defenses of the tropical marine seaweed *Canistrocarpus cervicornis* against herbivory by sea urchin. *Brazilian Journal of Oceanography*. 58(3): 213-218.
- Blevins, S.M. & Bronze, M.S. (2010). Robert Koch and the “golden age” of bacteriology. *International Journal of Infectious Diseases*. 14(9): 744-751.
- Brindhadevi, K.; LewisOscar, F.; Mylonakis, E.; Shanmugam, S.; Verma, T.N. & Pugazhendhi, A. (2020). Biofilm and Quorum sensing mediated pathogenicity in *Pseudomonas aeruginosa*. *Process Biochemistry*. 96: 49-57.

- Costerton, J.W.; Stewart, P.S. & Greenberg, E.P. (1999). Bacterial biofilms: A common cause of persistent infections. *Science*. 284: 1318-1322.
- Cremades, J.; Barreiro, R.; Maneiro, I. & Saunders, G.W. (2011). A new taxonomic interpretation of the type of *Plocamium cartilagineum* (plocamiales, florideophyceae) and its consequences. *European Journal of Phycology*. 46(2): 125-142.
- Cunha, B.A. (2004). Historical aspects of infectious diseases, part I. *Infectious Disease Clinics of North America*. 18(1): xi-xv.
- Darias, J.; Rovirosa, J.; San Martín, A.; Diaz, A.R.; Dorta, E. & Cueto, M. (2001). Furoplocamioids A-C, novel polyhalogenated furanoid noboterpenes from *Plocamium cartilagineum*. *Journal of natural Products*. 64(11).
- Della Sala, D.A. (2018). Oceans and global change: One blue planet. *Encyclopedia of the Anthropocene*. 2(3): 17-19.
- Díaz-Marrero, A.; Cueto, M.; Dorta, E.; Rovirosa, J.; San-Martín, A. & Darias, J. (2002). New halogenated monoterpenes from the red alga *Plocamium cartilagineum*. *Tetrahedron*. 58: 8539-8542.
- Dixon, P.S. (1967). The typification of *Fucus cartilagineus* L. and *F. corneus* Huds. *Blumea*. XV(1).
- Dowling, A.; O' Dwyer, J. & Adley, C.C. (2017). Antimicrobial research: Novel bioknowledge and educational programs. Formatex Research Center [e-Book]. A.Méndez-Vilas (Ed.).
- Dréno, B.; Pécastaings, S.; Corvec, S.; Veraldi, S.; Khammari, A. & Roques, C. (2018). *Cutibacterium acnes* (*Propionibacterium acnes*) and acne vulgaris: a brief look at the latest updates. *Journal of the European Academy of Dermatology and Venereology*. 32(2): 5-14.
- El Shafay, S.M.; Ali, S.S. & El-Sheekh, M.M. (2016). Antimicrobial activity of some seaweeds species from Red sea, against multidrug resistant bacteria. *Egyptian Journal of Aquatic Research*. 42(1): 65-74.
- Falanga, A.; Lombardi, L.; Franci, G.; Vitiello, M.; Iovene, M.R.; Morelli, G.; Galdiero, M. & Galdiero, S. (2016). Marine antimicrobial peptides: nature provides templates for the design of novel compounds against pathogenic bacteria. *International Journal of Molecular Sciences*. 17(5): 785.
- Fang, Y.; Yang, C.; Yue, Z.; Lic, X.; Muc, Q.; Liao, G. & Yua, B. (2020). Natural products as LSD1 inhibitors for cancer therapy. *Acta Pharmaceutica Sinica B*. 1-11.
- Feitosa, V.A.; Almeida, V.C.; Malheiros, B.; Castro, R. D.; Barbosa, L.R.S.; Cerize, N.N.P. & Rangel-Yagui, C.O. (2019). Polymeric micelles of pluronic F127 reduce hemolytic potential of amphiphilic drugs. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*. 180: 177-185.
- Feroz, B. (2018). Saponins from Marine Macroalgae: A Review. *Journal of Marine Science: Research & Development*. 8(4).
- Flowers, L. & Grice, E.A. (2020). The Skin Microbiota: Balancing Risk and Reward. *Cell Host and Microbe*. 28(2): 190-200.
- Freeman, C.D.; Klutman, N.E. & Lamp, K.C. (1997). Metronidazole. A therapeutic review and update. *Drugs*. 54(5): 679-708.
- Freitas, R.; Martins, A.; Silva, J.; Alves, C.; Pinteus, S.; Alves, J.; Teodoro, F.; Ribeiro, H.M.; Gonçalves, L.; Petrovski, Ž.; Branco, L.; Pedrosa, R. (2020). Highlighting the biological potential of the brown seaweed *Fucus spiralis* for skin applications. *Antioxidants*. 9(7): 1-21.
- Fricks-Lima, J.; Hendrickson, C.M.; Allgaier, M.; Zhuo, H.; Wiener-Kronish, J.P.; Lynch, S.V. & Yang, K. (2011). Differences in biofilm formation and antimicrobial resistance of *Pseudomonas aeruginosa*

isolated from airways of mechanically ventilated patients and cystic fibrosis patients. *International Journal of Antimicrobial Agents*. 37(4): 309-315.

Fridman, O.; Goldberg, A.; Ronin, I.; Shores, N. & Balaban, N.Q. (2014). Optimization of lag time underlies antibiotic tolerance in evolved bacterial populations. *Nature*. 513: 418-421.

Gad, S.C. (2005). Drug discovery Handbook. *Wiley Interscience*. New Jersey, USA.

Gastalho, S.; Silva, G.J. & Ramos, F. (2014). Antibiotics in aquaculture and bacterial resistance : Health care impact. *Acta Farmacêutica Portuguesa*. 3(1): 29-45.

Gerits, E.; Blommaert, E.; Lippell, A.; O'Neill, A.J.; Weytjens, B.; De Maeyer, D.; Fierro, A.C.; Marchal, K.; Marchand, A.; Chaltin, P.; Spincemaille, P.; De Brucker, K.; Thevissen, K.; Cammue, B.P.A.; Swings, T.; Liebens, V.; Fauvart, M.; Verstraeten, N. & Michiels, J. (2016). Elucidation of the mode of action of a new antibacterial compound active against *Staphylococcus aureus* and *Pseudomonas aeruginosa*. *PLoS ONE*. 11(5).

Goossens, H.; Ferech, M.; Vander Stichele, R. & Elseviers, M. (2005). Outpatient antibiotic use in Europe and association with resistance: a cross-national database study. *The Lancet*, 365: 579-587.

Grice, E.A. & Dawson, T.L. (2017). Host-microbe interactions: *Malassezia* and human skin. *Current Opinion in Microbiology*. 40: 81-87.

Guo, N.; Yu, L.; Meng, R.; Fan, J.; Wang, D.; Sun, G. & Deng, X. (2008). Global gene expression profile of *Saccharomyces cerevisiae* induced by dictamnine. *Yeast*. 25: 631-641.

Hao, D. & Xiao, P. (2020). Pharmaceutical resource discovery from traditional medicinal plants: pharmacophylogeny and pharmacophylogenomics. *Chinese Herbal Medicines*. 12 (2): 104-117.

Hu, Q.P.; Cao, X.M.; Hao, D.L. & Zhang, L.L. (2017). Chemical Composition, Antioxidant, DNA Damage Protective, Cytotoxic and Antibacterial Activities of *Cyperus rotundus* Rhizomes Essential Oil against Foodborne Pathogens. *Scientific Reports*. 7.

Huang, Z.; Wang, Y.H.; Zhu, H.Z.; Andrianova, E.P.; Jiang, C.Y.; Li, D.; Ma, L.; Feng, J.; Liu, Z-P.; Xiang, H.; Zhulin, I.B. & Liu, S.J. (2019). Cross talk between chemosensory pathways that modulate chemotaxis and biofilm formation. *American Society of Microbiology*. 10(1): 1-15.

Inés, C.; Argandona, V.H.; San-Martín, A.; Díaz-Marrero, A.R.; Cueto, M. & González-Coloma, A. (2004). Cytotoxic Activity of Halogenated Monoterpenes from *Plocamium cartilagineum*. *Verlag der Zeitschniff fur Naturforschung*. 59: 339-344.

Jang, J.; Hur, H.G.; Sadowsky, M.J.; Byappanahalli, M.N.; Yan, T. & Ishii, S. (2017). Environmental *Escherichia coli*: ecology and public health implications—a review. *Journal of Applied Microbiology*. 123(3): 570-581.

Karou, S.D.; Tchacondo, T.; Ouattara, L.; Anani, K.; Savadogo, A.; Agbonon, A.; Attaia, M.B.; Souza, C.; Sakly, M. & Simporé, J. (2011). Antimicrobial, antiplasmodial, haemolytic and antioxidant activities of crude extracts from three selected Togolese medicinal plants. *Asian Pacific Journal of Tropical Medicine*. 4(10): 808-813.

Kavita, K.; Singh, V.K. & Jha, B. (2014). 24-Branched Δ^5 sterols from *Laurencia papillosa* red seaweed with antibacterial activity against human pathogenic bacteria. *Microbiological Research*. 169(4): 301-306.

Kim, J.H.; Lee, J.E.; Kim, K.H. & Kang, N.J. (2018). Beneficial effects of marine algae-derived carbohydrates for skin health. *Marine Drugs*. 16(11): 1-20.

- Kleinschmidt, S.; Huygens, F.; Faoagali, J.; Rathnayake, I.U. & Hafner, L.M. (2015). *Staphylococcus epidermidis* as a cause of bacteremia. *Future Microbiology*. 10(11): 1859-1879.
- Knaack, D.; Idelevich, E.A.; Schleimer, N.; Molinaro, S.; Kriegeskorte, A.; Peters, G. & Becker, K. (2019). Bactericidal activity of bacteriophage endolysin HY-133 against *Staphylococcus aureus* in comparison to other antibiotics as determined by minimum bactericidal concentrations and time-kill analysis. *Diagnostic Microbiology and Infectious Disease*. 93: 362-368.
- Kohanski, M.A.; Dwyer, D.J. & Collins, J.J. (2010). How antibiotics kill bacteria: From targets to networks. *Nature Reviews Microbiology*. 8(6): 423-435.
- Korostynska, O.; Mason, A.; Nakouti, I.; Jansomboon, W. & Al-Shamma'a1, A. (2016). Monitoring use of antibiotics in aquaculture. *Marine and Ocean Ecosystems*.
- Lambert, P.A. (2002). Cellular impermeability and uptake of biocides and antibiotics in Gram-positive bacteria and mycobacteria. *Journal of Applied Microbiology Symposium Supplement*. 92(1): 46-54.
- Lazar, V. (2011). Quorum sensing in biofilms - How to destroy the bacterial citadels or their cohesion/power? *Anaerobe*. 17(6): 280-285.
- Le Loir, Y.; Baron, F. & Gautier, M. (2003). *Staphylococcus aureus* and food poisoning. *Genetics and Molecular Research*. 2(1): 63-76.
- López, D.; Vlamakis, H. & Kolter, R. (2010). Biofilms. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*. 2(7).
- Martinez, J.L. (2014). General principles of antibiotic resistance in bacteria. *Drug Discovery Today: Technologies*. 11(1): 33-39.
- Mayachiew, P. & Devahastin, S. (2008). Antimicrobial and antioxidant activities of Indian gooseberry and galangal extracts. *LWT - Food Science and Technology*. 41(7): 1153-1159.
- McDermott, P.F.; Walker, R.D. & White, D.G. (2003). Antimicrobials: modes of action and mechanisms of resistance. *International Journal of Toxicology*. 22(2): 135-143.
- Menkem, Z.E.; Ngangom, B.L.; Tamunjoh, S.S.A. & Boyom, F.F. (2018). Antibiotic residues in food animals: Public health concern. *Acta Ecologica Sinica*. 39(5): 411-415.
- Menoita, E.; Santos, V.; Testas, C.; Gomes, C. & Santos, A. (2012). Biofilms: Knowing the Entity. *Journal of Aging & Inovation*. 1(2): 23-32.
- Morehead, M.S. & Scarbrough, C. (2018). Emergence of Global Antibiotic Resistance. *Primary Care - Clinics in Office Practice*. 45(3): 467-484.
- Muhammad, A.; Feng, X.; Rasool, A.; Sun, W. & Li, X. (2020). Production of plant natural products through engineered *Yarrowia lipolytica*. *Biotechnology Advances*. 43.
- Munita, J.M. & Arias, C.A. (2016). Mechanisms of antibiotic resistance. *Microbiology Spectrum*. 4(2).
- Mynderse, J. & Faulkner, D.J. (1978). Variation in the halogenated monoterpene metabolites of *Plocamium cartilagineum* and *P. violaceum*. *Phytochemistry*. 17: 237-248.
- Nguyen, A.V. & Soulika, A.M. (2019). The dynamics of the skin's immune system. *International Journal of Molecular Sciences*. 20(8): 1-53.
- Ojeda-Sana, A.M.; Baren, C.M.; Elechosa, M.A.; Juárez, M.A. & Moreno, S. (2013). New insights into antibacterial and antioxidant activities of rosemary essential oils and their main components. *Food Control*. 31(1): 189-195.

- Ostrosky, E.A.; Mizumoto, M.K.; Lima, M.E.L.; Kaneko, T.M.; Nishikawa, S.O. & Freitas, B.R. (2008). Métodos para avaliação da atividade antimicrobiana e determinação da Concentração Mínima Inibitória (CMI) de plantas medicinais. *Revista Brasileira de Farmacognosia*. 18(2): 301-307.
- O'Toole, G.A. (2011). Microtiter Dish Biofilm Formation Assay. *Journal of Visualized Experiments*. 47
- Otto, M. (2009). *Staphylococcus epidermidis* – the “accidental” pathogen. *Nature Reviews Microbiology*. 7(8): 555-567.
- Pérez, M.J.; Falqué, E. & Herminia, D. (2016). Antimicrobial action of compounds from marine seaweed. *Marine Drugs*. 14(3): 1-38.
- Pinteus, S.; Lemos, M.F.L.; Alves, C.; Neugebauer, A.Z.; Silva, J.; Thomas, O.P.; Botana, L.M.; Gaspar, H. & Pedrosa, R. (2018). Marine invasive macroalgae: turning a real threat into a major opportunity - the biotechnological potential of *Sargassum muticum* and *Asparagopsis armata*. *Algal Research*. 34: 217-234.
- Pinteus, S.; Lemos, M.F.L.; Simões, M.; Alves, C.; Silva, J.; Gaspar, H.; Martins, A.; Rodrigues, A. & Pedrosa, R. (2020). Marine invasive species for high-value products' exploration – Unveiling the antimicrobial potential of *Asparagopsis armata* against human pathogens. *Algal Research*. 52.
- Pinteus, S.; Silva, J.; Alves, C.; Horta, A.; Thomas, O.P. & Pedrosa, R. (2017). Antioxidant and cytoprotective activities of *Fucus spiralis* seaweed on a human cell in vitro model. *International Journal of Molecular Sciences*. 18(2): 1-14.
- Priyadharshini, S.; Bragadeeswaran, S.; Prabhu, K. & Ran, S.S. (2012). Antimicrobial and hemolytic activity of seaweed extracts *Ulva fasciata* (Delile 1813) from Mandapam, Southeast coast of India. *Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine*. 1: S38-S39.
- Rabin, N.; Zheng, Y.; Opoku-Temeng, C.; Du, Y.; Bonsu, E. & Sintim, H. (2015). Biofilm formation mechanisms and targets for developing antibiofilm agentes. *Future Medicinal Chemistry*. 7(4): 493-512.
- Rezanka, T. & Dembitsky, V.M. (2001). Polyhalogenated homosesquiterpenic fatty acids from *Plocamium cartilagineum*. *Phytochemistry*. 57: 607-611.
- Rizzo, C.; Genovese, G.; Morabito, M.; Faggio, C.; Pagano, M.; Spanò, A.; Zammuto, V.; Minicante, S.A.; Manghisi, A.; Cigala, R.M.; Crea, F.; Marino, F. & Gugliandolo, C. (2017). Potential antibacterial activity of marine macroalgae against pathogens relevant for aquaculture and human health. *Journal of Pure and Applied Microbiology*. 11(4): 1695-1706.
- Rodrigues, D., Costa-Pinto, A.R., Sousa, S., Vasconcelos, M.W., Pintado, M.M., Pereira, L. & Freitas, A. C. (2019). *Sargassum muticum* and *Osmundea pinnatifida* enzymatic extracts: Chemical, structural, and cytotoxic characterization. *Marine Drugs*, 17(4), 209.
- Roggia, I.; Dalcin, A.J.F.; Ourique, A.F.; Cruz, I.B.M.; Ribeiro, E.E.; Mitjans, M.; Vinardell, M.P. & Gomes, P. (2019). Protective effect of guarana-loaded liposomes on hemolytic activity. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*. 187.
- Rovirosa, J.; Moena, J. & San-Martín, A. (1988). Two chemical types of the red alga *Plocamium cartilagineum* from Chile. *Biochemical, Systematics and Ecology*. 16(7/8): 593-595.
- Roy, R.; Tiwari, M.; Donelli, G. & Tiwari, V. (2018). Strategies for combating bacterial biofilms: A focus on anti-biofilm agents and their mechanisms of action. *Virulence*. 9(1): 522-554.
- Samanta, I. & Bandyopadhyay, S. (2020). Antimicrobial Resistance in Agriculture. *Elsevier*. 29-38.

- San-Martín, A. & Rovirosa, J. (1986). Variations in the Halogenated Monoterpene Metabolites of *Plocamium cartilagineum* of the Chilean Coast. *Biochemical, Systematics and Ecology*. 14(5): 459-461.
- San-Martin, A.; Negrete, R. & Rovirosa, J. (1991). Insecticide and acaricide activities of polyhalogenated monoterpenes from chilean *Plocamium cartilagineum*. *Phytochemistry*. 30(7): 2165-2168.
- Sarikahya, N.B.; Nalbantsoy, A.; Top, H.; Gokturk, R.S.; Sumbul, H. & Kirmizigul, S. (2017). Immunomodulatory, hemolytic and cytotoxic activity potentials of triterpenoid saponins from eight *Cephalaria* species. *Phytomedicine*. 38: 135-144.
- Saunders, G.W. & Lehmkuhl, K.V. (2005). Molecular divergence and morphological diversity among four cryptic species of *Plocamium* (Plocamiales, Florideophyceae) in northern Europe. *European Journal of Phycology*. 40(3): 293-312.
- Shilling, A.J.; von Salm, J.; Sanchez, A.R.; Kee, Y.; Amsler, C.D.; McClintock, J.B. & Baker, B.J. (2019). Anverenes B-E, new polyhalogenated monoterpenes from the Antarctic Red Alga *Plocamium cartilagineum*. *Marine Drugs*. 17(230).
- Silhavy, T.J.; Kahne, D. & Walker, S. (2010). The Bacterial Cell Envelope. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*. 2.
- Silva, F.; Ferreira, S.; Queiroz, J.A. & Domingues, F.C. (2011). Coriander (*Coriandrum sativum* L.) essential oil: Its antibacterial activity and mode of action evaluated by flow cytometry. *Journal of Medical Microbiology*. 60(10): 1479-1486.
- Smith, P. (2008). Antimicrobial resistance in aquaculture. *Revue scientifique et technique (International Office of Epizootics)*. 27(1): 243-264.
- Solano, C.; Echeverz, M. & Lasa, I. (2014). Biofilm dispersion and quorum sensing. *Current Opinion in Microbiology*. 18(1): 96-104.
- Souza, L.; Dore, C.M.; Castro, A.J.; Azevedo, T.C.; Oliveira, M.T.; Moura, M.F.; Benevides, N.M. & Leite, E.L. (2012). Galactans from the red seaweed *Amansia multifida* and their effects on inflammation, angiogenesis, coagulation and cell viability. *Biomedicine & Preventive Nutrition*. 2(3): 154-162.
- Souza, R.B.; Frota, A.F.; Silva, J.; Alves, C.; Neugebauer, A. Z.; Pinteus, S.; Rodrigues, J.A.G.; Cordeiro, E.M.S.; Almeida, R.R.; Pedrosa, R. & Benevides, N.M.B. (2018). In vitro activities of kappa-carrageenan isolated from red marine alga *Hypnea musciformis*: antimicrobial, anticancer and neuroprotective potential. *International Journal of Biological Macromolecules*. 112: 1248-1256.
- Stoodley, P.; Sauer, K.; Davies, D.G. & Costerton, J. W. (2002). Biofilms as complex differentiated communities. *Annual Review of Microbiology*. 56: 187-209.
- Stoodley, P.; Wilson, S.; Hall-Stoodley, L.; Boyle, J.D.; Lappin-Scott, H.M. & Costerton, J.W. (2001). Growth and Detachment of Cell Clusters from Mature Mixed-Species Biofilms. *Applied and Environmental Microbiology*. 67(12): 5608-5613.
- Taukoorah, U.; Lall, N. & Mahomoodally, F. (2016). *Piper betle* L. (betel quid) shows bacteriostatic, additive, and synergistic antimicrobial action when combined with conventional antibiotics. *South African Journal of Botany*. 105: 133-140.
- Timmers, M.A.; Dias, D.A. & Urban, S. (2012). Application of HPLC-NMR in the Identification of Plocamenone and Isoplocamenone from the marine red alga *Plocamium angustum*. *Marine Drugs*. 10: 2089-2102.
- Tolker-Nielsen, T. (2015). Biofilm Development. *Microbiology Spectrum*. 3(2).

- Toyofuk, M.; Inaba, T.; Kiyokawa, T.; Obana, N.; Yawata, Y. & Nomara, N. (2016). Environmental factors that shape biofilm formation. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry*. 80(1): 7-12.
- Trentin, D.S.; Giordani, R.B. & Macedo, A.J. (2013). Biofilmes bacterianos patogênicos: aspectos gerais, importância clínica e estratégias de combate. *Revista Liberato*. 14(22): 113-238.
- Valentão, P.; Trindade, P.; Gomes, D.; Guedes de Pinho, P.; Mouga, T. & Andrade, P.B. (2010). *Codium tomentosum* and *Plocamium cartilagineum*: Chemistry and antioxidant potential. *Food Chemistry*. 119(4): 1359-1368.
- Veiga, A.; Toledo, M.G.T.; Rossa, L.S.; Mengarda, M.; Stofella, N.C.F.; Oliveira, L.J.; Gonçalves, A.G. & Murakami, F.S. (2019). Colorimetric microdilution assay: Validation of a standard method for determination of MIC, IC_{50%}, and IC_{90%} of antimicrobial compounds. *Journal of Microbiological Methods*. 162: 50-61.
- White, T.C.; Findley, K.; Dawson, T.L.; Scheynius, A.; Boekhout, T.; Cuomo, C.A.; Xu, J. & Saunders, C.W. (2014). Fungi on the skin: Dermatophytes and *Malassezia*. *Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine*. 4(8): 1-16.
- WHO. (2014). Antimicrobial Resistance: Global Report on Surveillance. <http://www.who.int/>.
- Windels, E.M.; Michiels, J.E.; Bergh, B.; Fauvart, M. & Michiels, J. (2019). Antibiotics: Combatting tolerance to stop resistance. *American Society for Microbiology*. 10(5).
- Wright, G.D. (2010). Q&A: Antibiotic resistance: where does it come from and what can we do about it? *BMC Biology*. 8:123.
- Wu, H.; Lee, B.; Yang, L.; Wang, H.; Givskov, M.; Molin, S.; Høiby, N. & Song, Z. (2011). Effects of ginseng on *Pseudomonas aeruginosa* motility and biofilm formation. *FEMS Immunology and Medical Microbiology*. 62: 49-56.
- Xu, S.Y.; Huang, X. & Cheong, K.L. (2017). Recent advances in marine algae polysaccharides: isolation, structure, and activities. *Marine Drugs*. 15(12): 1-16.
- Xu, T. & Zhang, X.H. (2013). *Edwardsiella tarda*: an intriguing problem in aquaculture. *Aquaculture*. 431: 129-135.
- Yaraksa, N.; Anunthawan, T.; Theansungnoen, T.; Daduang, S.; Araki, T.; Dhiravisit, A. & Thammasirirak, S. (2014). Design and synthesis of cationic antibacterial peptide based on Leucrocin i sequence, antibacterial peptide from crocodile (*Crocodylus siamensis*) white blood cell extracts. *Journal of Antibiotics*. 67 (3): 205-212.
- Young, R.M.; Von Salm, J.L.; Amsler, M.O.; Lopez-Bautista, J.; Amsler, C.D.; McClintock, J.B. & Baker, B.J. (2013). Site-specific variability in the chemical diversity of the Antarctic red alga *Plocamium cartilagineum*. *Marine Drugs*. 11(6): 2126-2139.
- Yu, J.E.; Cho, M.Y.; Kim, J.W. & Kang, H.Y. (2012). Large antibiotic-resistance plasmid of *Edwardsiella tarda* contributes to virulence in fish. *Microbial Pathogenesis*. 52(2): 259-266.
- Yuan, Y.V. & Walsh, N.A. (2006). Antioxidant and antiproliferative activities of extracts from a variety of edible seaweeds. *Food and Chemical Toxicology*. 44: 1144 – 1150.
- Zeeuwen, P.L.J.M.; Kleerebezem, M.; Timmerman, H.M. & Schalkwijk, J. (2013). Microbiome and skin diseases. *Current Opinion in Allergy and Clinical Immunology*. 13(5): 514-520.

Zerrifi, S.E.A.; Khalloufi, F.E.; Oudra, B. & Vasconcelos, V. (2018). Seaweed bioactive compounds against pathogens and microalgae: Potential uses on pharmacology and harmful algae bloom control. *Marine Drugs*. 16(2): 55.

ANEXOS

Anexo A: Potencial antimicrobiano vs. potencial de inibição da formação de biofilme

Tabela A.1 Compilação dos potenciais antimicrobiano e de inibição da formação de biofilme, do extrato DM e das frações EA, ED, AE e AQ da alga *Plocamium cartilagineum*.

Estirpe	Potencial antimicrobiano					Potencial de inibição da formação de biofilme				
	DM	EA	ED	AE	AQ	DM	EA	ED	AE	AQ
<i>C. albicans</i>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
<i>E. coli</i>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
<i>K. pneumoniae</i>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
<i>P. aeruginosa</i>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
<i>S. aureus</i>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
<i>S. enteritidis</i>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
<i>A. aquoriorum</i>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
<i>A. hydrophila</i>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
<i>E. tarda</i>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
<i>V. anguillarum</i>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
<i>C. acnes</i>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
<i>M. furfur</i>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
<i>S. epidermidis</i>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>